

Aus der Klinik für Anaesthesiologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. B. Zwißler

Einfluss verschiedener Konzentrationen der Glykokalyx-Bestandteile
Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat auf die Hämostase;
eine in-vitro Studie

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Max Christoph Enzinger
aus Ulm
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Rehm

Mitberichterstatter: PD Dr. Erwin Strobel
PD Dr. Christoph Bidlingmaier

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Judith-Irina Buchheim (geb. Pagel)

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.03.2018

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	7
1.1. Das Gefäßendothel und die (Wieder-)Entdeckung der endothelialen Glykokalyx	7
1.2. Struktur der endothelialen Glykokalyx	8
1.3. Funktion der endothelialen Glykokalyx	10
1.4. Rolle der endothelialen Glykokalyx bei (vaskulären) Erkrankungen	12
1.5. Hypothese und Studienziele	15
1.5.1. Primäres Studienziel	15
1.5.2. Sekundäre Studienziele	15
2. Methodik	16
2.1. Studiendesign	16
2.1.1. Einschlusskriterien	16
2.1.2. Ausschlusskriterien	16
2.1.3. Ethik	16
2.1.4. Rekrutierung & Aufklärung der Probanden	16
2.2. Zielkonzentrationen der Testsubstanzen	17
2.3. Aliquotierung der Testsubstanzen	17
2.4. Probenentnahme und Konservierung	18
2.5. Hämostaseologische Globaltests	19
2.5.1. Probenherstellung	20
2.5.2. Gewinnung von thrombozytenarmem Citratplasma	20
2.5.3. Thromboplastinzeit (TPZ, engl. Prothrombin Time = PT)	20
2.5.4. aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)	22
2.5.5. Thrombinzeit (TZ)	23
2.6. Durchflusszytometrie	24
2.6.1. Grundlagen der Durchflusszytometrie	24
2.6.2. Messung und graphische Darstellung	26
2.6.3. Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch PMNL & Prinzip der Messung	28
2.6.4. Gewinnung von Leukozytenreichem Plasma (LRP)	28
2.6.5. Probenherstellung	29
2.6.6. Messreihe zur Aktivierung von PMNL durch lösliche Stimuli	30
2.7. Rotationsthrombelastometrie	31
2.7.1. Grundlagen der Rotationsthrombelastometrie	31

2.7.2.	Messprinzip ROTEM®	32
2.7.3.	ROTEM®-Ansätze	33
2.7.4.	graphische Darstellung und Auswertung	34
2.7.5.	Probenherstellung	36
2.8.	<i>Materialverzeichnis</i>	38
2.9.	<i>Statistik</i>	41
3.	Ergebnisse	42
3.1.	<i>Probandengruppe</i>	42
3.2.	<i>Hämostaseologische Globaltests</i>	43
3.3.	<i>Durchflussszytometrie</i>	45
3.4.	<i>Rotationsthrombelastometrie</i>	47
3.4.1.	EXTEM	47
3.4.2.	FIBTEM	53
3.4.3.	INTEM	56
3.4.4.	HEPTEM	62
3.4.5.	Vergleich FIBTEM/EXTEM	68
3.4.6.	Vergleich INTEM/HEPTEM	72
3.4.7.	Summierter Effekt der Glykokalyx-Bestandteile auf die Gerinnung	78
4.	Diskussion	85
4.1.	<i>Individueller Effekt der Testsubstanzen auf die Gerinnung</i>	85
4.1.1.	Heparansulfat	85
4.1.2.	Syndecan-1	86
4.1.3.	Hyaluronan	86
4.2.	<i>Glykokalyx-Bestandteile und ihr Einfluss auf die Hämostase</i>	87
4.3.	<i>Glykokalyx-Bestandteile als Marker für Schädigung der Endothelial Surface Layer</i>	94
4.4.	<i>Effekt der Testsubstanzen auf PMNL-Aktivierung</i>	97
4.5.	<i>Schlussfolgerungen und Ausblick</i>	98
5.	Synopsis/Zusammenfassung	100
6.	Anhang	107
6.1.	<i>Eidesstattliche Versicherung</i>	108
6.2.	<i>Ethikvotum</i>	109
6.3.	<i>Referenzwerte ROTEM®</i>	110
7.	Danksagung	111
8.	Literaturverzeichnis	112

Abkürzungsverzeichnis

A10	Amplitude nach 10min, Maß für Gerinnselfestigkeit
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
CFT	Clot Formation Time = Gerinnselfbildungszeit
CT	Clotting Time = Gerinnungszeit
DHR	Dihydrorhodamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGL	Endothelial Glycocalyx Layer, Synonym zu ESL
ESL	Endothelial Surface Layer; Schicht aus Glykokalyx und gebundenen Plasmaproteinen
FACS	Fluorescence activated Cell Sorting
fMLP	Formylmethionin-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Forward Scattered Light = Vorwärtsstreulicht
HA	Hyaluronic acid = Hyaluronan
HBSS	Hank's Buffered Saline Solution
HS	Heparansulfat
INR	International Normalized Ratio
LRP	Leukozytenreiches Plasma
MCF	Maximum Clot Firmness = Maximale Gerinnselfestigkeit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMA	Phorbol Mystrate Acetate
PMNL	Polymorphonuclear Neutrophilic Leucocytes = Granulozyten
ROS	Reactive Oxygen Species = Reaktive Sauerstoffspezies, (,Sauerstoffradikale')
SSC	Side Scattered Light = Seitwärtsstreulicht
SY	Syndecan-1 = CD138
TEG	Thrombelastographie
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
α	Alpha-Winkel

1. Einleitung

1.1. Das Gefäßendothel und die (Wieder-)Entdeckung der endothelialen Glykokalyx

Das vaskuläre Endothel ist die innerste Zellschicht, die unsere Gefäße auskleidet und damit das Gefäßlumen anatomisch vom umgebenden Gewebe abgrenzt. Mit einer geschätzten Masse von circa 110 g [1] im erwachsenen Menschen scheint es sich um ein recht kleines Organ zu handeln. Doch dieser Schein trügt: von der Aorta bis hin zu den Kapillaren und zurück zu den großen Hohlvenen sind alle Gefäße unseres Körpers von dieser Schicht ausgekleidet, dies entspricht einer Gesamtoberfläche von etwa 350 m² [1]. Auch die Funktion des Endothels beschränkt sich nicht auf die rein physikalische Barriere zwischen Gefäß und umgebendem Gewebe, vielmehr ist es der Ort, an dem Austausch zwischen Blut und Gewebe stattfindet. Im Kapillarendothel wird Sauerstoff an das Gewebe abgegeben und Kohlenstoffdioxid vom Blut aufgenommen. Kommt es zu einer lokalen Infektion, so werden vom Endothel Botenstoffe ausgesendet, die Abwehrzellen den Weg weisen. Kommt es zu einer Gefäßverletzung, lagern sich Thrombozyten ans Endothel an und initiieren die Blutgerinnung. Eine Schädigung oder gar Zerstörung des Endothels hat gravierende Folgen für die Gesundheit. Arteriosklerose, die Verhärtung und Beschädigung von Gefäßen, welche hauptsächlich durch Risikofaktoren des westlichen Lebensstils wie Rauchen, Hypercholesterinämie durch fettreiche Ernährung oder Diabetes durch zuckerreiche Ernährung gefördert wird, ist eine globale Volkskrankheit. Bei Fortschreiten der Endothelzerstörung durch Arteriosklerose kommt es zu Herzinfarkten und Schlaganfällen, laut WHO den beiden häufigsten globalen Todesursachen [2]. Bei kritisch Kranken kommt es zu Flüssigkeitsverlagerungen aus den Gefäßen ins umgebende Gewebe, Ödeme entstehen [3]. Als Ursache dafür wurde lange eine Dysfunktion beziehungsweise Zerstörung des Endothels gesehen.

In den 1940er Jahren wurde erstmals eine Schicht, die das Endothel von innen auskleidet, sich also zwischen dem zirkulierenden Blut und den Endothelzellen befindet, beschrieben [4, 5]. Lange Zeit wurde dieser Schicht kaum eine funktionelle Bedeutung zugeschrieben, da sie sich elektronenmikroskopisch unter Einfärbung mit Rutheniumrot lediglich mit einer Dicke von weniger als 20 nm darstellte [6]. Großes Interesse an dieser Schicht kam erst Anfang der 1980er-Jahre auf: Klitzman und Duling hatten an 32 anästhesierten Hamstern den Hämatokrit in Kapillaren und Arteriolen des Musculus cremaster, sowie in der Arteria carotis gemessen. Es zeigte sich für Kapillaren ($10,4 \pm 2,0$ %) und Arteriolen ($13,9 \pm 1,2$ %) ein erheblich

gegenüber der Arteria carotis ($53,2 \pm 0,6 \%$) erniedrigter Hämatokrit [7]. Bis dato hatte man den intravitalmikroskopisch beobachtbaren Effekt, dass Erythrozyten in Kapillaren die Gefäßwand nicht berühren, mit dem Fåhræus-Lindqvist-Effekt erklärt. Er besagt, dass in kleinen Gefäßen und Kapillaren die Erythrozyten durch wandnahe Scherkräfte in die Mitte des Gefäßes verdrängt werden, sich die Viskosität des Blutes vermindert und somit der Blutfluss in Gefäßabschnitten, die teils wenig größer als die Zellen selbst sind, aufrecht erhalten wird [8]. Desjardins und Duling zeigten 1990 in einem ähnlichen Versuchsaufbau an Kapillaren in Hamster-Cremasteres, dass die Perfusion mit Heparinase, einem Enzym das Heparin und Heparansulfat spalten kann, binnen Minuten zu einer Verdoppelung des Kapillarhämatokrits führte [9]. Die rein physikalische Erklärung für den erniedrigten Kapillarhämatokrit mit dem Fåhræus-Lindqvist-Effekt war also unzureichend, offensichtlich bestand eine Schicht zwischen Endothelzellen und Blutstrom, die durch Heparinase zerstört werden konnte. Ähnliches zeigte die Gruppe um Duling 1999 für Hyaluronidase und schlossen „This finding and our prior observations suggest that hyaluronan and other glycoconjugates are required for assembly of the matrix on the endothelial surface.” [10]. Die Darstellung einer intakten Glykokalyx gestaltete sich weiterhin schwierig, da herkömmliche Fixierungstechniken die fragile Struktur bereits vor Durchführung einer Elektronenmikroskopie zerstörten. Mit einem modernen Lanthan-basierten Fixierungsverfahren gelang es der Gruppe um Rehm, eine intakte endotheliale Glykokalyx mit einem Durchmesser von circa $0,5 \mu\text{m}$ darzustellen [11]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass mit größerem Durchmesser arterieller Gefäße auch die dicke der Glykokalyx zunimmt. Van Haaren et al. zeigten eine Glykokalyxdicke von 2 bis $3 \mu\text{m}$ in kleinen Arterien [12], Megens et al. eine Dicke von $4,5 \mu\text{m}$ in Karotiden [13].

1.2. Struktur der endothelialen Glykokalyx

Die endotheliale Glykokalyx ist eine Struktur aus Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen, die das vaskuläre Endothel luminal auskleidet [14]. Da sie sich in einem ständigen Gleichgewicht aus Auf- und Abbau befindet und zudem Komponenten endothelialen und plasmatischen Ursprungs hat, ist die Darstellung eines statischen Bildes nicht möglich: „the layer as a whole [...] is very dynamic, with membrane-bound molecules being constantly replaced and no distinct boundary between locally synthesized and associated elements“ [14]. Das ‚Rückgrat‘ der Glykokalyx bilden in der Endothelzellmembran verankerte Proteoglykane. Ihr Kernprotein ist am oder im Endothel verankert, während sie mit einer oder mehrerer Glykosaminoglykan-Seitenketten ins vaskuläre Lumen ragen. Man unterscheidet mehrere Typen von Proteoglykanen nach ihrer

(nicht-)Verankerung in der Endothelzellmembran. Die Syndecane sind mit ihrem Kernprotein als Transmembrandomäne fest in der Endothelzellmembran [15] verankert. Glypikane ankern über ihr Kernprotein via Glykosylphosphatidylinositol-Ankern in der Endothelzellmembran [16]. Weitere Proteoglykane wie Perlecan [17], Mimecan oder Biglycan [18] werden nach Synthese sezerniert und haben damit keine Verankerung in der Zellmembran.

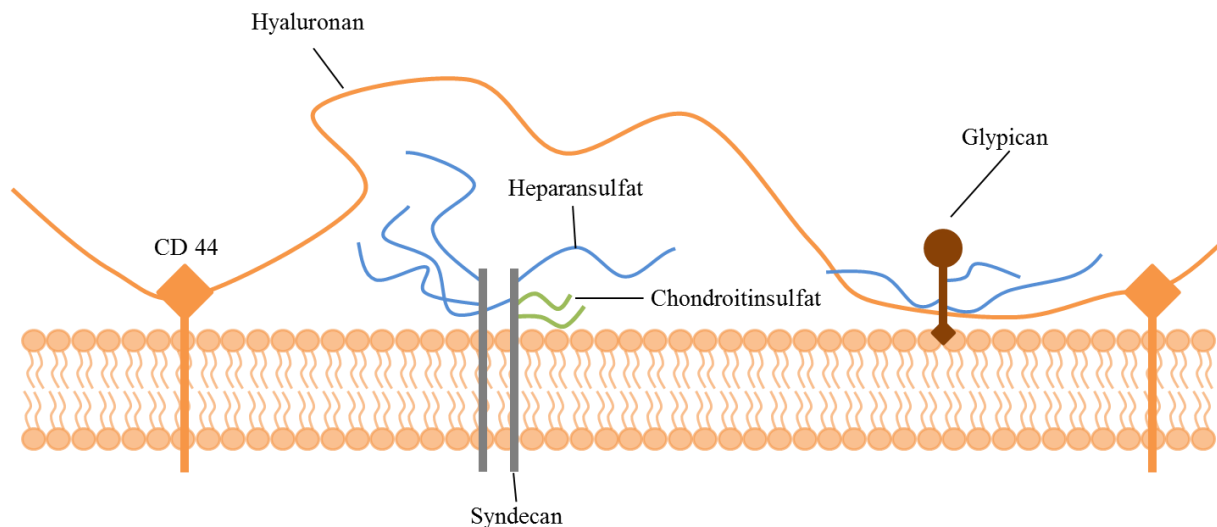


Abbildung 1 Schematische, vereinfachte Darstellung der endothelialen Glykokalyx mit den Proteoglykanen Syndecan und Glypican und den Glykosaminoglykanen Heparansulfat, Hyaluronan und Chondroitinsulfat; modifiziert nach [19]

Die Glykosaminoglykane, die meist die Seitenketten der Proteoglykane bilden, sind lineare Polymere aus Disacchariden und unterscheiden sich nach Länge, Sulfatierung und Acetylierung. In der Glykokalyx sind fünf verschiedene Glykosaminoglykane vertreten: Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, welches auch als Typ B Chondroitinsulfat bezeichnet wird, Keratansulfat, sowie Hyaluronan [14]. Nicht alle Glykosaminoglykane binden an alle Proteoglykane, es gibt also beispielsweise Heparansulfat-Proteoglykane, die hauptsächlich mit Heparansulfat aufgeladen sind, wie beispielsweise Syndecan-1. Heparansulfat-Proteoglykane stellen mit 50 – 90 % die größte Proteoglykan-Fraktion der Glykokalyx dar [20], gefolgt von Chondroitin-/Dermatansulfat-Proteoglykanen. Das Verhältnis zwischen den Glykosaminoglykanen Heparansulfat und Chondroitin/Dermatansulfat in der Glykokalyx wird mit 4:1 angegeben [21]. Hyaluronan nimmt als großes polymeres Molekül (bis 10^4 kDa) eine Sonderrolle unter den Glykosaminoglykanen der Glykokalyx ein, da es nicht an ein Proteoglykan-Kernprotein gebunden ist. Ihm werden mehrere Bindungsmöglichkeiten zur Zellmembran zugeschrieben, unter anderem via CD44-Rezeptor [22] und den auf der Zytosolseite der Zellembbran gelegenen Hyaluronan-Synthasen [23]. Möglicherweise ist Hyaluronan auch teilweise gar

nicht mit der Zellmembran verbunden [14]. Abbildung 1 zeigt ein vereinfachtes Schema der endothelialen Glykokalyx.

Als dritte Substanzklasse werden der Glykokalyx teilweise die Glykoproteine der Selektin-, Integrin- und Immunglobulin-Familien zugeordnet, allesamt mittels Transmembrandomäne in der Endothelzellmembran verankert. Diese spielen wichtige Rollen bei der Leukozytenadhäsion und -transmigration, Thrombozytenaggregation und einer Vielfalt weiterer Prozesse. Die der Immunglobulin-Superfamilie zugehörigen Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) dienen auch als Marker für Endothelzellschäden [14].

1.3. Funktion der endothelialen Glykokalyx

1896 beschrieb der britische Physiologe Ernest Starling die Barrierefunktion von Blutgefäßen [24]. Er erklärte die Tatsache, dass Flüssigkeit trotz des intravasal höheren hydrostatischen Drucks nicht ins Interstitium exsudiert, mit einem kolloidosmotischen Druckgradienten, der von einem intravasal hohen und im Interstitium niedrigeren kolloidalen Druck aufrecht erhalten wird. Diese Erklärung wurde für gut hundert Jahre aufrecht erhalten, bis mehrere Studien zeigten, dass trotz intra- und extravasal angeglicher Kolloiddrücke die vaskuläre Barriere funktionierte [25, 26]. Wendete man Starlings Gleichung auf diese Fälle an, käme es aufgrund des fehlenden nach intravasal gerichteten kolloidosmotischen Gradienten zu einer starken Nettofiltration ins Interstitium, was de facto nicht der Fall war. Auch würden die filtrierte Volumina die Kapazität des Lymphsystems übersteigen; es zeigten sich aber keine Ödeme [27]. Ernest Starling war in seiner Arbeit vom Endothel als einziger Barriere zwischen Gefäßlumen und Interstitium ausgegangen. Ende der 1970er Jahre entdeckten Curry und Michel, dass Ferritin im Blut nie ganz an die Endothelzellwand anliegt und schlossen „It may be identified with the ruthenium red staining layer described by Luft (1966)“ [28]. Sie gaben damit einen ersten Hinweis für die Beteiligung der endothelialen Glykokalyx an der vaskulären Barriere. Im Jahr 2000 zeigten Vink und Duling, dass große Dextrane ($\geq 70 \text{ kDa}$) die Glykokalyx nicht durchdringen konnten, während kleinere Dextrane (40 kDa) die Glykokalyx durchdrangen. Negativ geladene Moleküle derselben Größe permeierten die Glykokalyx nicht. Albumin (67 kDa) und Fibrinogen (340 kDa) durchdrangen die Glykokalyx, allerdings deutlich langsamer als die kleinen Dextrane. Die Autoren schlossen „These findings demonstrate that for anionic molecules size and charge have a profound effect on the penetration rate into the glycocalyx.“ [30]. Im Jahr 2004 postulierten Rehm et al. das „double barrier concept“, das die vaskuläre Barriere als Kombination von endothelialer Glykokalyx und dem Endothel selbst betrachtet. Sie hatten die Koronarien isolierter

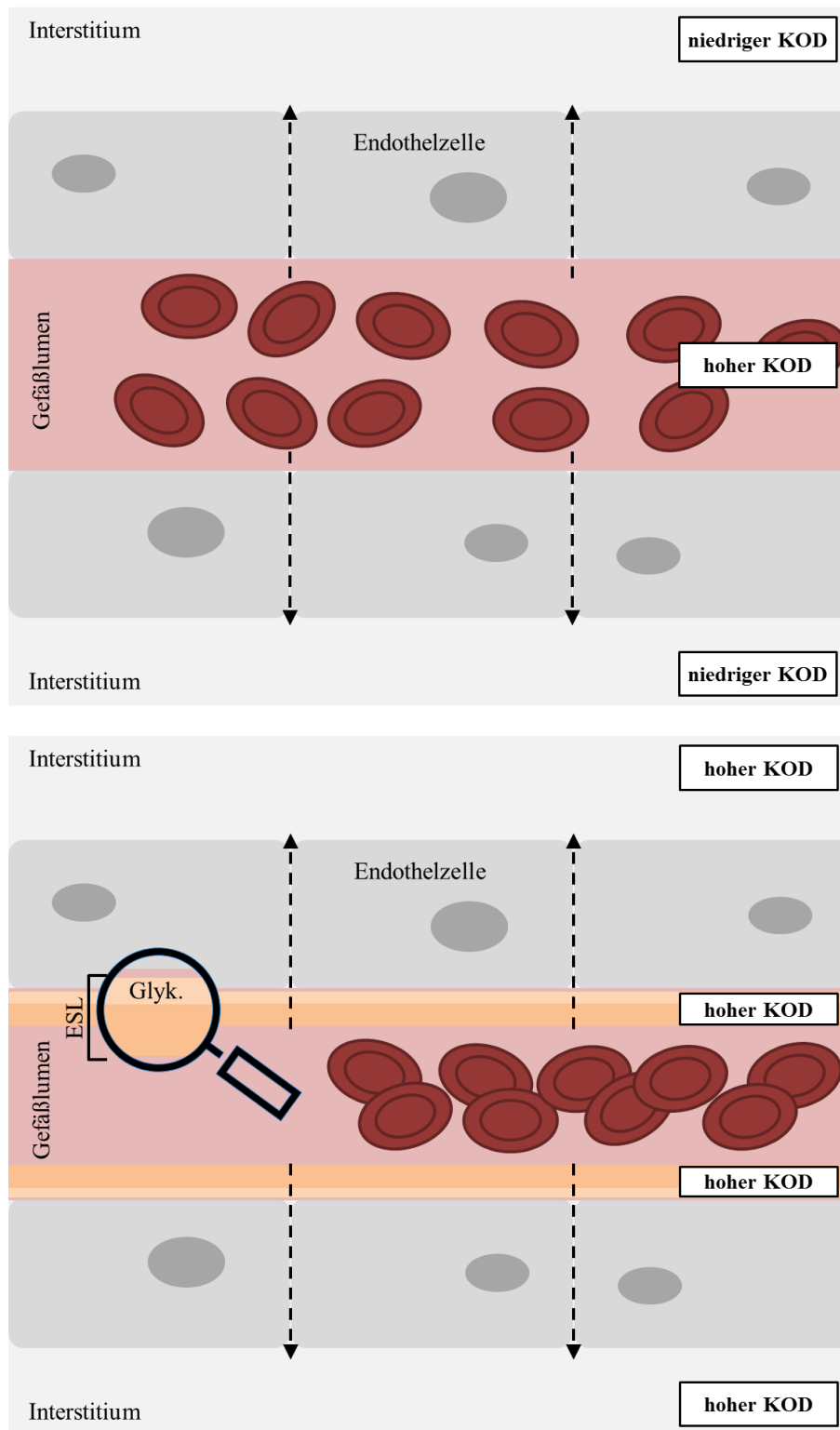


Abbildung 2 zeigt schematisch die vaskuläre Barriere nach der ‚klassischen‘ Starling-Formel (links), sowie der ‚revidierten‘ Starling-Formel (unten). KOD = kolloidosmotischer Druck; ESL = Endothelial Surface Layer; Glyk. = Glykokalyx; die Pfeile zeigen die Richtung des hydrostatischen Drucks an;

Abbildung modifiziert nach [29]

Meerschweinchenherzen mit Hydroxyethylstärke und Albumin perfundiert und die Nettofiltration gemessen. In einer zweiten Gruppe applizierten sie vor der Perfusion mit den kolloidalen Lösungen Heparinase, um die Glykokalyx zu zerstören. Die mit Heparinase vorbehandelten Herzen zeigten eine um 25 % erhöhte koronare Leckage. Die Autoren schlossen „The endothelial glycocalyx acts as a competent barrier for water and colloids.” [11]. Adamson et al. integrierten schließlich die Eigenschaften der Glykokalyx in die Starling-

Gleichung und zeigten, dass der kolloidosmotische Gradient tatsächlich in den meisten Gefäßen nicht zwischen Intravasalraum und Interstitium besteht, sondern zwischen der Glykokalyx mit hohem kolloidosmotischem Druck und dem schmalen Raum zwischen Glykokalyx und Endothel mit niedrigem kolloidosmotischen Druck bei ähnlichen Drücken intravasal und im Interstitium [25]. Chappell et al. schließen in ihrer Übersichtsarbeit „Expedition Glykokalyx“: „Festzuhalten bleibt, dass das Starling-Prinzip, nach dem ein kolloidosmotischer Druck dem Filtrationsdruck entgegensteht und damit einem Wasserausstrom entgegenwirkt, an sich nach wie vor gültig ist. Integriert man nun die Glykokalyx in das Starling-Modell, so wird letztendlich präzise definiert, an welcher Stelle der kolloidosmotische Gradient tatsächlich aufgebaut wird – es ist der ESL“ [29]. Der „ESL“, der Endothelial Surface Layer, ist die physiologische Funktionsform der Glykokalyx, sie wird mit Molekülen plasmatischen Ursprungs aufgeladen. Jacob et al. zeigten, dass die Art des Kolloids, mit dem die Glykokalyx aufgeladen ist, große Bedeutung für die Gefäßbarriere hat [26]. Abbildung 2 veranschaulicht die Bedeutung der endothelialen Glykokalyx für die vaskuläre Barrierefunktion im Vergleich zwischen ‚klassischer‘ und ‚revidierter‘ Starling-Formel.

1.4. Rolle der endothelialen Glykokalyx bei (vaskulären) Erkrankungen

Die endotheliale Glykokalyx ist eine hoch fragile Struktur, die enzymatisch und durch ‚shear stress‘ abgetragen werden kann [29]. Dieses ‚Shedding‘ der Glykokalyx hat weitreichende Konsequenzen und wurde in den letzten Jahren für unterschiedliche Krankheitsbilder untersucht. So konnte tierexperimentell gezeigt werden, dass atriales natriuretisches Peptid (ANP) zu Shedding der Glykokalyx führt [31]. ANP wird bei Volumenbelastung in den Vorhöfen ausgeschüttet, um das Blutvolumen mittels Diurese zu senken. Untersuchungen an Patienten zum Volume Loading unterstützen die These, dass die durch Volumenbelastung geschädigte Glykokalyx zu Flüssigkeitsverlusten ins Interstitium führt. Rehm et al. zeigten, dass hypervolämisch applizierte Boli von Hydroxyethylstärke und Humanalbumin nur einen Volumeneffekt von 43 % beziehungsweise 38 % hatten und zeigten mit direkten Blutvolumenmessungen, dass die Glykokalyxdichte unter hypervolämischer Hämodilution abnahm. Bei normovolämischer Hämodilution war dies nicht der Fall [32, 33]. Chappell et al. folgerten in „Expedition Glykokalyx“: „Offensichtlich scheint die Aufrechterhaltung einer intravasalen Normovolämie einer der Schlüssel des Anästhesisten zur Erhaltung der endothelialen Glykokalyx zu sein [...] Eine intakte Glykokalyx kann also Flüssigkeits- und Proteinverluste in den interstitiellen Raum verhindern.“ [29]. Auch das Shedding der Glykokalyx unter Ischämie/Reperfusion konnte bei Tierversuchen gezeigt und bereits klinisch

bestätigt werden. Chappell et al. zeigten, dass in Meerschweinchenherzen eine warme Ischämiezeit von 20 Minuten genügte, um die Glykokalyx zu zerstören [34]. Mulivor und Lipowsky zeigten ähnliches bei Darmgefäßen von Ratten, hier führte eine 60-minütige Ischämie zu einer signifikanten Abnahme der Glykokalyx-Dichte [21]. Klinisch konnten Rehm et al. die Zerstörung der Glykokalyx an Patienten mit großen Gefäßeingriffen zeigen, indem sie mittels ELISA die Konzentrationen von Syndecan-1- und Heparansulfat im Plasma der Patienten maßen. Sie stiegen mit steigender Dauer und Ausmaß der Ischämie [35]. Nieuwdorp et al. zeigten 2006 in einem Experiment an gesunden Probanden, dass Hyperglykämie zum Shedding von Glykokalyx-Bestandteilen und einer Abnahme der Glykokalyx-Dicke führt [36]. Es ist wahrscheinlich, dass eine verminderte Glykokalyx bei Diabetikern zur Pathogenese der kardiovaskulären Begleiterkrankungen beiträgt [29]. Möglicherweise ist die Zerstörung der Glykokalyx ein notwendiger Schritt für die hämatogene Metastasierung von Tumoren: Heparanase, ein Enzym, das Heparansulfat spaltet, ist in Tumorzellen überexprimiert. Es setzt auch angiogenetische Faktoren frei und fördert so die Angiogenese in Tumoren [37]. Auch für die Volkskrankheit Arteriosklerose kommt der Glykokalyx eine hohe Bedeutung zu: Vink et al. zeigten im Jahr 2000 an Gefäßen im Musculus cremaster von Hamstern, dass das für die Pathogenese der Arteriosklerose hoch relevante Low Density Lipoprotein (LDL) zu einer deutlichen Reduktion der Glykokalyx und einer gesteigerten Thrombozytenadhäsion führte [38]. Van den Berg et al. zeigten 2006 an Mäusen, dass eine cholesterinreiche Ernährung unter anderem zur Verminderung der Glykokalyx-Dicke führte und schlossen „It is concluded [...] that vascular sites with diminished glycocalyx are more vulnerable to proinflammatory and atherosclerotic sequelae“ [39]. Nelson et al. zeigten 2008 erhöhte Syndecan-1- und Glykosaminoglykan-Konzentrationen im Blut von Patienten im septischen Schock. Hierbei waren die Glykosaminoglykan-Werte im Blut der nicht-Überlebenden signifikant gegenüber der Gruppe der Überlebenden erhöht [40]. Eine Erhöhung der Permeabilität der Glykokalyx für Makromoleküle durch den bei Sepsis-Patienten stark erhöhten Tumornekrose-Faktor alpha (TNF- α) hatten Henry und Duling bereits im Jahr 2000 im Tiermodell zeigen können [41]. Ostrowski und Johansson zeigten im Jahr 2012 ein Shedding der Glykokalyx im Blut von Polytraumapatienten. Sie postulierten einen Zusammenhang der Glykokalyx-Zerstörung und der traumainduzierten Koagulopathie (TIC): „Endothelial glycocalyx degradation induces endogenous heparinization in patients with severe injury and early traumatic coagulopathy“ [42]. Sie hatten in einer prospektiven Studie das Blut von 77 Traumapatienten in einem Level 1 Traumazentrum auf unterschiedlichste Werte zur Hämostase, Inflammation,

Endothelzellschaden und - anhand von Syndecan-1-Konzentrationen - zum Shedding der Glykokalyx untersucht. Mittels eines von ihnen entwickelten Scores aus Messwerten in der Rotationsthrombelastografie (TEG), einem viskoelastischen Verfahren zur Beurteilung der Hämostase, hatten sie die Patienten in eine „endogen heparinisierte“ (n = 4) und eine „nicht heparinisierte“ (n = 73) Gruppe stratifiziert. Die „endogen heparinisierte“ Patientengruppe hatte gegenüber den anderen Patienten einen signifikant erhöhten Injury Severity Score, erhielt signifikant mehr Transfusionen von Erythrozytenkonzentrat und zeigte signifikant erhöhte Werte von Thrombomodulin, einem Marker für Endothelzellschädigung. Vor allem aber zeigten sie vierfach gegenüber der „nicht heparinisierten“ Gruppe erhöhte Werte von Syndecan-1 (116 *ng/mL* versus 31 *ng/mL*). Ostrowski und Johansson schlossen „The endothelial glycocalyx represents a large structure within the hemostatic system [...] that contains significant amounts of heparin-like substances that, when degraded in patients with critical illness (evidenced by a rise in syndecan 1 levels), may induce endogenous autoheparinization” [42].

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von Glykokalyx-Bestandteilen auf die Hämostase tiefer zu ergründen. Ostrowski und Johansson hatten als Parameter für ein Shedding der Glykokalyx Syndecan-1 Werte gemessen, ein Proteoglykan, das für die Verankerung der Glykokalyx im Endothel verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit soll nun ergründet werden, inwieweit Syndecan-1, oder die in der Glykokalyx in großer Menge vertretenen Glykosaminoglykane Hyaluronan und Heparansulfat die Hämostase beeinflussen, um möglichen Kausalitäten von Gerinnungsstörungen bei kritisch kranken Patienten mit Shedding der Glykokalyx näher zu kommen.

1.5. Hypothese und Studienziele

Es wird postuliert, dass hohe Blutkonzentrationen von den Glykokalyxbestandteilen Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat Einfluss auf eine funktionierende Blutgerinnung haben können. Besonders hohe Blutwerte werden im Rahmen der Sepsis detektiert. In dieser in vitro Studie wird vermutet, dass eine steigende Blutkonzentration dieser drei Substanzen mit einer gesteigerten Beeinträchtigung der Hämostase vergesellschaftet ist. Durch die Anwendung verschiedener Blutkonzentrationen (klinikinterne Erfahrungswerte von unterschiedlichen Patientengruppen) und deren Analyse mittels hämostaseologischer Globaltests (Quick, aPTT, Thrombinzeit) und Rotationsthrombelastometrie sollen beeinträchtigende Faktoren der Blutgerinnung identifiziert und charakterisiert werden.

1.5.1. Primäres Studienziel

Eine mögliche Beeinträchtigung der Blutgerinnung durch verschiedene Konzentrationen der Glykokalyxbestandteile Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat soll mittels Rotationsthrombelastometrie detektiert werden.

1.5.2. Sekundäre Studienziele

Eine mögliche Beeinträchtigung der Blutgerinnung durch verschiedene Konzentrationen der Glykokalyxbestandteile Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat wird mittels der hämostaseologischen Globaltests Quick, aPTT und Thrombinzeit überprüft.

Desweiteren wird der Einfluss der Glykokalyxbestandteile Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat auf die Granulozytenfunktion untersucht.

2. Methodik

2.1. Studiendesign

In dieser Studie soll das Blut von 10 internistisch gesunden (Risikoklassifikation I-II der American Society of Anesthesiologists: ASA I/II), männlichen Probanden verwendet werden.

2.1.1. Einschlusskriterien

- Männliche Probanden, die nach umfassender Aufklärung schriftlich in die Teilnahme an der Studie eingewilligt haben
- Internistisch gesunde Probanden (ASA I/II)
- Alter zwischen 18 und 40 Jahren

2.1.2. Ausschlusskriterien

- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie
- Einstufung in die Risikogruppen III, IV oder V nach der Klassifikation der American Society of Anesthesiologists
- Probanden, die nicht einwilligungsfähig sind
- Weibliches Geschlecht
- Bekannte Blutgerinnungsstörung
- Bekannter Alkohol-, Drogen- oder Medikamentenabusus

2.1.3. Ethik

Die Ethikkommission an der LMU München erkannte der Studie (Projekt-Nummer 386-13) im Schreiben ihres Vorsitzenden Professor W. Eisenmenger vom 30.10.2013 die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zu. Das Schreiben ist der Dissertationsschrift angehängt (Anhang 6.2).

2.1.4. Rekrutierung & Aufklärung der Probanden

Die Probanden wurden aus den Assistenzärzten der Klinik für Anaesthesiologie des Klinikums der Universität München rekrutiert. Die Probanden wurden mit Hilfe des abgefassten Aufklärungsbogens über Nutzen, Risiken und Ziele der Studie sowie die durchzuführenden Tests durch einen Prüfarzt ausführlich informiert und aufgeklärt. Fragen und Bedenken wurden im Aufklärungsgespräch geklärt und gegebenenfalls auf dem Aufklärungsbogen dokumentiert. Der Proband wurde ebenso darüber aufgeklärt, dass übrige Blutproben in der Klinik für Anaesthesiologie ein Jahr lang aufbewahrt werden, um diese gegebenenfalls bei weiterführenden Fragestellungen im Rahmen einer Veröffentlichung zu

verwenden. Im Falle einer Zustimmung wurde ein Termin zur Blutentnahme vereinbart. Der Proband erhielt eine Kopie des Aufklärungsbogens. Dem Probanden wurden folgende Voraussetzungen für die Blutentnahme mitgeteilt: „Zur Blutentnahme hat der Proband nüchtern zu erscheinen, mindestens 10 Tage im Voraus dürfen keine Medikamente, welche die Blutgerinnung beeinflussen (beispielsweise Acetylsalicylsäure) eingenommen werden. Des weiteren ist von Sport oder anstrengender körperlicher Betätigung zwei Tage vor Blutentnahme abzusehen.“

Am Tag der Blutentnahme wurde die Befolgung oben genannter Punkte abgefragt und bei Bejahung durch den Probanden die Blutentnahme durchgeführt.

2.2. Zielkonzentrationen der Testsubstanzen

Aus unveröffentlichten klinikinternen Untersuchungen unterschiedlicher Patientengruppen wurden für Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat jeweils drei Zielkonzentrationen K1, K2 und K3 abgeleitet. Die Konzentrationen K3 entsprechen Konzentrationen, die im Serum von Sepsis-Patienten gemessen wurden. Tabelle 1 zeigt die entsprechenden Zielkonzentrationen und gibt eine Übersicht über die für die unterschiedlichen Untersuchungen eingesetzten Konzentrationen: Durchflusszytometrie und hämostaseologische Globaltests wurden an Proben der jeweiligen Konzentration K3 durchgeführt, die Rotationsthrombelastometrie an Proben aller Konzentrationen K1, K2 und K3.

	Konzentration	Zielkonzentration	FACS	Hämostas. Globaltests	ROTEM
Syndecan-1	K 1	180 ng/mL			X
	K 2	480 ng/mL			X
	K 3	650 ng/mL	X	X	X
Hyaluronan	K 1	400 ng/mL			X
	K 2	700 ng/mL			X
	K 3	1800 ng/mL	X	X	X
Heparansulfat	K 1	18 µg/mL			X
	K 2	25 µg/mL			X
	K 3	35 µg/mL	X	X	X

Tabelle 1 Zielkonzentrationen K1, K2 und K3 für die jeweiligen Tests

2.3. Aliquotierung der Testsubstanzen

Die Testsubstanzen wurden käuflich erworben und entsprechend den Herstellerangaben zu Arbeitslösungen rekonstituiert. Anschließend wurden Aliquots für die spätere Inkubation erstellt. Tabelle 2 zeigt die jeweils in den Aliquots enthaltene Masse der Testsubstanzen.

Zweck	Zielkonzentration	in 10 μL Aliquot		
		Syndecan-1	Hyaluronan	Heparansulfat
FACS	K 3	60 <i>ng</i>	170 <i>ng</i>	3,0 μg
Hämost. Globaltests	K 3	1950 <i>ng</i>	5400 <i>ng</i>	105 μg
ROTEM	K 1	54 <i>ng</i>	120 <i>ng</i>	5,4 μg
	K 2	144 <i>ng</i>	210 <i>ng</i>	7,5 μg
	K 3	195 <i>ng</i>	540 <i>ng</i>	10,5 μg

Tabelle 2 Masse der Testsubstanzen in den Aliquots

2.4. Probenentnahme und Konservierung

Der Proband erschien nüchtern und versicherte glaubhaft, in den letzten zwei Tagen keinen Sport getrieben zu haben. Die Entnahme erfolgte peripher venös am sitzenden Probanden mittels Mutilfly®-Sets (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) in S-Monovetten® (idem). Es kam zu keinen vasovagalen Reaktionen oder anderen Zwischenfällen. Die Probanden hatten Gelegenheit, nach der Blutentnahme Wasser zu trinken und wurden nach 15-minütiger Beobachtungszeit wieder nach Hause entlassen. Jedem Probanden wurden 41 *mL* Blut entnommen, es kam zu keinem hämodynamisch relevanten Blutverlust. Tabelle 3 gibt Übersicht über die Volumina, die für die einzelnen Testverfahren verwendet wurden.

Verwendungszweck	Typ S-Monovette®	Inhalt	Anzahl	Volumen
Hämost. Globaltests	3 <i>mL</i> 9NC (Coagulation)	Tri-Natrium-Citrat-Lösung 0,106 <i>mol/L</i> , 0,30 <i>mL</i>	4	12 <i>mL</i>
ROTEM	10 <i>mL</i> 9NC (Coagulation)	Tri-Natrium-Citrat-Lösung 0,106 <i>mol/L</i> , 1,00 <i>mL</i>	2	20 <i>mL</i>
FACS	9 <i>mL</i> Lithium-Heparin	16 <i>I.E.</i> Heparin/ <i>mL</i> Blut	1	9 <i>mL</i>
Summe			7	41 <i>mL</i>

Tabelle 3 Übersicht über Blutvolumina und verwendete S-Monovetten® für die jeweiligen Tests

Die Blutproben für klinische Chemie, Durchflusszytometrie und Thromboelastometrie wurden direkt für die Analysen verwendet, wobei die Citrat-Proben für letztere bei 37°C im Wasserbad aufbewahrt und nur jeweils kurz zum Inkubieren der Substanzen entnommen wurden.

2.5. Hämostaseologische Globaltests

Um den Einfluss der Glykokalyxbestandteile Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat auf die Hämostase zu beurteilen, wurden zunächst im klinischen Gebrauch alltägliche Blutgerinnungsparameter im Labor des Instituts für Laboratoriumsmedizin erhoben. In der plasmatischen Gerinnungsanalytik wird generell differenziert zwischen so genannten Globaltests [43], welche die Aktivität verschiedener Gerinnungsfaktoren gleichzeitig erfassen und Einzelfaktorentests. Letztere werden bei pathologischen Ergebnissen der Globaltests zur Abklärung eventueller Einzelfaktorenpathologien eingesetzt. Für die vorliegende Studie beschränkten wir uns auf folgende Globaltests: Thromboplastinzeit (Quick, INR) für die extrinsische Gerinnungsaktivierung, aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) für die intrinsische Gerinnungsaktivierung, sowie Thrombinzeit (TZ) als indirekten Parameter für Fibrinogenkonzentration und -funktion (Vgl. Schema in Abbildung 3).

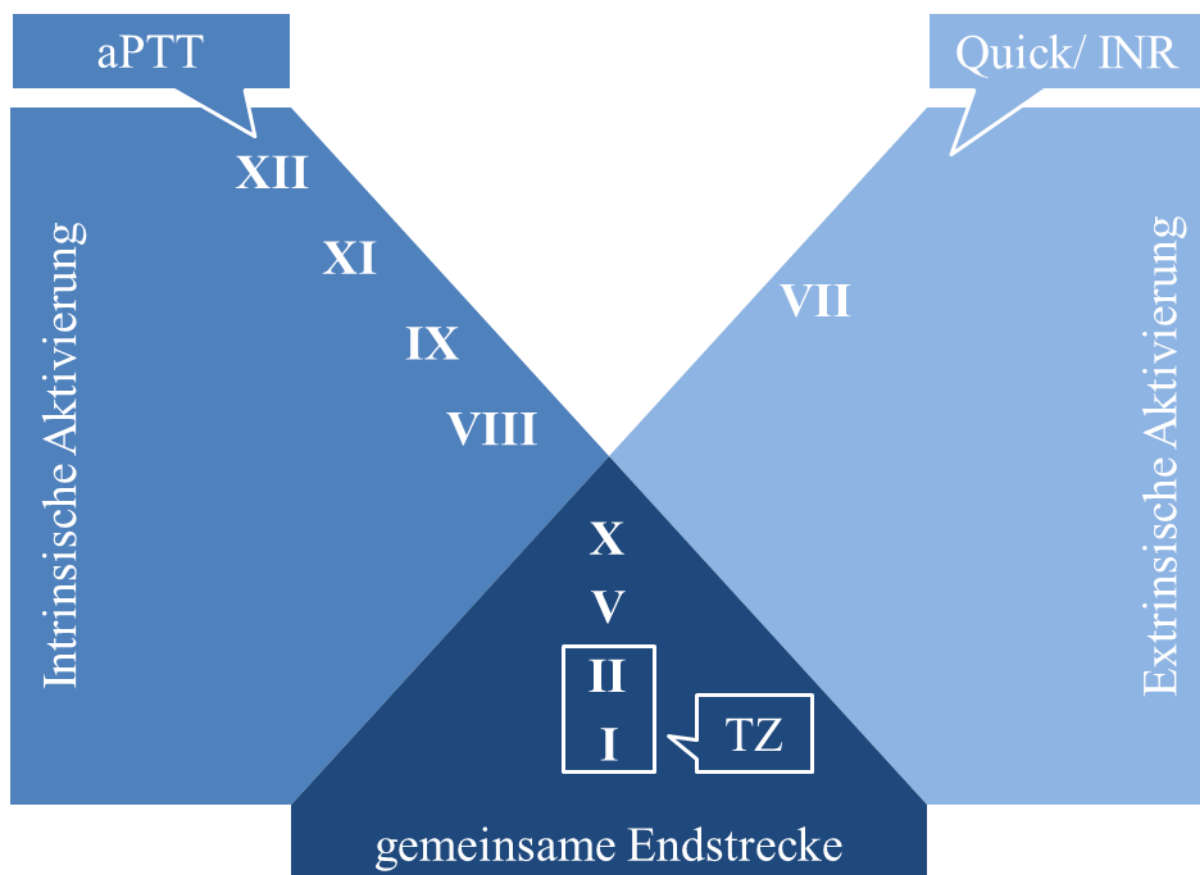


Abbildung 3 Globaltests der plasmatischen Gerinnung

2.5.1. Probenherstellung

Zur Herstellung der Testproben für die hämostaseologischen Globaltests wurden drei der 3mL 9NC S-Monovetten® jeweils 300 μ L Citrat-Vollblut entnommen und jeweils in ein vorbereitetes 10 μ L Aliquot mit einer der Testsubstanzen Syndecan-1, Hyaluronan oder Heparansulfat pipettiert. Es wurde zweimal mit der Pipette vermischt und anschließend die 310 μ L inkubierten Vollbluts zurück in die entsprechende Monovette pipettiert. Die Zielkonzentration der Testsubstanzen im Citrat-Vollblut entsprach Konzentration K3. Tabelle 4 gibt Übersicht über die Volumina und Zielkonzentrationen. Die drei 3mL 9NC S-Monovetten® mit inkubiertem Citrat-Vollblut wurden gemeinsam mit der unveränderten Kontrollprobe zur Analyse an das Institut für Laboratoriumsmedizin gesendet.

	Zielkonzentration K3	in 10 μ L Aliquot = in finaler 3 mL-Probe
Kontrollprobe	-	-
Syndecan-1	650 ng/mL	1950 ng
Hyaluronan	1800 ng/mL	5400 ng
Heparansulfat	35 μ g/mL	105 μ g

Tabelle 4 Zielkonzentrationen und Masse der Testsubstanzen in Testprobe

Alle weiteren Schritte der hämostaseologischen Globaltests wurden durch Mitarbeiter des Instituts für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München am Standort Großhadern durchgeführt. Als Analysesystem diente das BCS® XP System (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland).

2.5.2. Gewinnung von thrombozytenarmem Citratplasma

Das in 3mL 9NC S-Monovetten® vorliegende Citrat-Vollblut wurde bei $1500 \times g$ für ≥ 15 min zentrifugiert und das überstehende thrombozytenarme Plasma abpipettiert. Es wurde für alle weiteren Tests weiterverwendet.

2.5.3. Thromboplastinzeit (TPZ, engl. Prothrombin Time = PT)

Die Thromboplastinzeit misst die Zeit zwischen Aktivierung der extrinsischen plasmatischen Gerinnung durch Thromboplastin und Bildung des Gerinnsels. Es wird die Aktivität der Faktoren VII, X, V und II erfasst. Die Gerinnselbildung kann mechanisch oder optisch detektiert werden. [44] Im klinischen Alltag hat die Thromboplastinzeit zwei Hauptindikationen: als Screening-Parameter wird sie nach Quick angegeben und meist gemeinsam mit der aPTT bestimmt. Zum Therapiemonitoring bei Patienten nach

mechanischem Herzklappenersatz, Vorhofflimmern oder rezidivierenden Lungenembolien wird die Thromboplastinzeit in Form der INR angegeben (siehe unten).

Testdurchführung zur Bestimmung der TPZ: „

„ In ein auf +37 °C vorgewärmtes Teströhrchen pipettieren	
Citratplasma	100 µL
1 min bei +37 °C inkubieren	
Thromborel® S Reagenz (auf +37 °C temperiert)	200 µL
Mit Zugabe von Thromborel® S Reagenz Stoppuhr bzw. Messstelle am Gerinnungsmessgerät starten und die Gerinnungszeit bestimmen.	"

Tabelle 5 Testdurchführung laut Hersteller [45]

Beim im Institut für Laboratoriumsmedizin standardmäßig verwendeten Reagenz Thromborel® S (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland) handelt es sich um ein kalziumhaltiges Thromboplastin aus humaner Plazenta. Dieses enthält sowohl Tissue Factor, als auch Phospholipide. Andere - rekombinant hergestellte - Thromboplastine müssen mit zusätzlichen pflanzlichen Phospholipiden versetzt werden, da diese die Gerinnungsaktivierung beeinflussen [46]. Tabelle 5 zeigt die Testdurchführung nach Angaben des Herstellers

Darstellungsform der Testergebnisse

In Deutschland wird die Thromboplastinzeit traditionell nach Quick [47] angegeben: Es wird eine Kalibrationskurve eines Normalplasmapools erstellt, das heißt Normalplasma wird sukzessive mit Kochsalzlösung verdünnt und die jeweiligen Thromboplastinzeiten ermittelt. Der Quick-Wert für das Patientenplasma ergibt sich aus derjenigen Kochsalz-Normalplasma-Mischung, welche die gleiche Thromboplastinzeit hat. Ein Quick-Wert von 25% entspricht also einer Mischung von 25% Normalplasma und 75% Kochsalzlösung [43]. Sowohl die Thromboplastinzeit in [s], als auch der Quick-Wert in [%] sind abhängig von genutztem Reagenz und Analysesystem. Um eine internationale Vergleichbarkeit der Thromboplastinzeit zu gewährleisten, wurde zu Beginn der 1980er Jahre die International Normalized Ratio (INR) durch Kirkwood [48] eingeführt und sukzessive von der WHO [49] und den Fachgesellschaften in die Leitlinien übernommen:

$$\text{Thromboplastinzeit} - \text{Ratio} = \frac{\text{Thromboplastinzeit des Patienten [s]}}{\text{mittlere Thromboplastinzeit [s] normaler Probanden}}$$

$$\text{International Normalized Ratio} = (\text{Thromboplastinzeit} - \text{Ratio})^{ISI}$$

ISI = International Sensitivity Index

Der ISI ist ein empirisches, meist vom Hersteller angegebenes Maß für die analytischen Eigenschaften der Reagenz/Gerätekombination im Verhältnis zum ersten WHO-Referenzthromboplastin ($ISI = 1,0$).

2.5.4. aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit misst die Gerinnungszeit nach Aktivierung der intrinsischen plasmatischen Gerinnung durch Oberflächenaktivatoren. Es wird die Aktivität der Kontaktfaktoren Präkallikrein, hochmolekulares Kininogen und Faktor XII, der Gerinnungsfaktoren XI, IX, VIII, X, V & II, sowie die Konzentration des gerinnbaren Fibrinogens erfasst [44]. Es handelt sich um einen zweistufigen Test: zunächst werden durch Zugabe eines Oberflächenaktivators und von Phospholipiden zu thrombozytenarmem Citratplasma die Kontaktfaktoren aktiviert. Im Anschluss wird durch Rekalzifizierung des Plasmas die Gerinnung aktiviert. Gemessen wird die Zeit von der Rekalzifizierung bis zur Gerinnselbildung in [s]. Das am Institut für Laboratoriumsmedizin standardmäßig verwendete Reagenz Dade® Actin® FSL (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Deutschland) enthält Ellagsäure als Oberflächenaktivator und Phospholipide aus Sojabohnen und Kaninchenhirn. Klinische Indikationen zur Bestimmung der aPTT sind einerseits das Screening auf Gerinnungspathologien und andererseits das Therapiemonitoring bei Patienten, die mit unfraktioniertem Heparin oder Thrombininhibitoren behandelt werden. Tabelle 6 zeigt die Testdurchführung nach Angaben des Herstellers.

Testdurchführung zur Bestimmung der aPTT:

" Calciumchlorid-Lösung auf +37 °C vorwärmen		
0,1 mL Dade® Actin® FSL Reagenz pro Teströhrchen auf +37 °C vorwärmen (vor Gebrauch mischen)		
In Kunststoffröhrchen wie folgt pipettieren:		
	zu untersuchende Probe	Kontrollplasma
Dade® Actin® FSL Reagenz (vorgewärmt)	0,1 mL	0,1 mL
Plasma	0,1 mL	—
Kotrollplasma	—	0,1 mL
Gut mischen und 3 Minuten bei +37 °C inkubieren		
vorgewärmte Calciumchlorid-Lösung	0,1 mL	0,1 mL
Bei Zugabe des $CaCl_2$ die Stoppuhr starten, gut mischen. Nach 20 Sekunden erstmals die Gerinnung überprüfen.		
"		

Tabelle 6 Testdurchführung laut Hersteller [50]

2.5.5. Thrombinzeit (TZ)

Die Thrombinzeit (TZ) misst die Zeit zwischen Zugabe von Thrombin (Faktor IIa) und Gerinnselbildung. Sie ist damit ein indirekter Parameter für die Fibrinogenkonzentration und –funktion [44]. Die Thrombinzeit wird in Sekunden angegeben. Klinisch ist sie weitgehend durch spezifischere Fibrinogenbestimmungen abgelöst worden, ist aber hochsensitiv für unfractioniertes Heparin. Tabelle 7 zeigt die Testdurchführung nach Angaben des Herstellers.

Testdurchführung zur Bestimmung der TZ:

" In ein auf +37 °C vorgewärmtes Teströhrchen pipettieren:	
Citratplasma	100 µL
BC-Thrombin-Reagenz (+37 °C)	250 µL
Mit Zugabe des Reagenzes Gerinnungszeit (z. B. Zeit für die Zunahme der Anfangsextinktion um 0,06) bestimmen "	

Tabelle 7 Testdurchführung laut Hersteller [51]

2.6. Durchflusszytometrie

2.6.1. Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messverfahren, das mithilfe eines monochromatischen Lasers Zellsuspensionen auf Streulicht und Fluoreszenz untersucht. Dadurch können die einzelnen Zellen anhand ihrer Größe und Granulierung (Streulicht), sowie ihrer Stoffwechselaktivität oder Antigenpräsentation (Fluoreszenz) beurteilt werden. [52, 53] Es können Zellen zwischen $0,2\ \mu\text{m}$ und $50\ \mu\text{m}$ unabhängig ihres Ursprungsgewebes analysiert werden [54]. Das benutzte FACScan™ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) nutzt einen Argonlaser der Wellenlänge 488nm (blau).

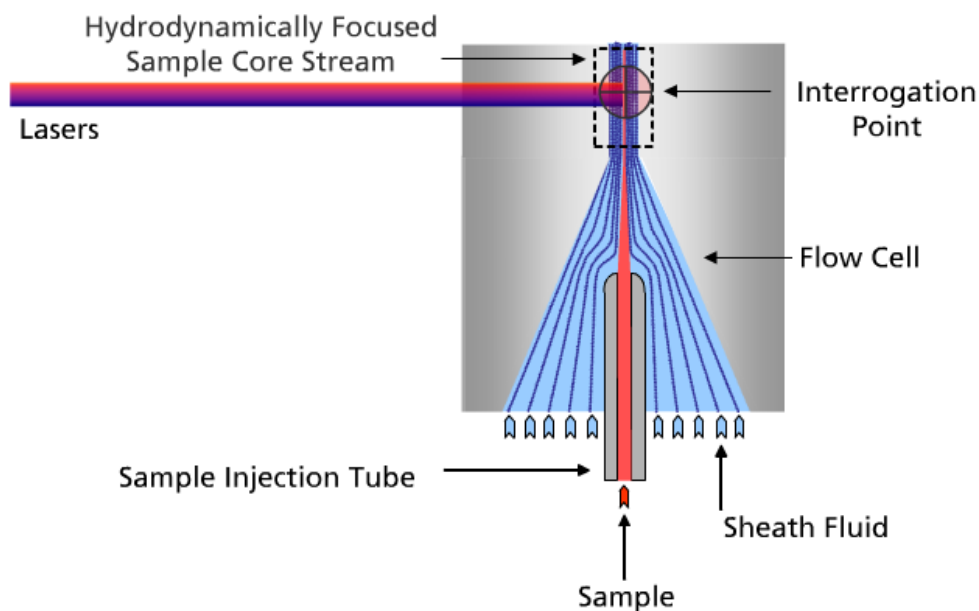


Abbildung 4 Hydrodynamische Fokussierung [54]

Zur Analyse wird die Zellsuspension mittels hydrodynamischer Fokussierung durch die Messküvette geleitet, sodass jede Zelle einzeln das Messfenster des Lasers passiert (Abbildung 4). Das beim Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle entstehende Streulicht wird horizontal und vertikal detektiert (vgl. Abbildung 5 „optische Anordnung“): Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scattered Light, 0° bis 10° Abweichung vom einfallenden Laserstrahl) wird durch eine Photodiode gemessen und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Dabei verhält sich die Signalstärke proportional zur Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scattered Light, 90° zum einfallenden Laserstrahl) wird durch Photomultiplier gemessen. Hier verhält sich die Signalstärke proportional zur Granulierung der Zelle. Photomultiplier verstärken die Signale der im 90° -Winkel gemessenen Parameter

(SSC und Fluoreszenz), das Seitwärtsstreulicht kann ohne Verstärkung per Photodiode detektiert werden. Durch unterschiedliche Fluoreszenzmarker (= Fluorochrome) können Stoffwechselaktivitäten oder - via monoklonaler Antikörper - antigenpräsentierende Zellen quantitativ dargestellt werden. Das Absorptionsmaximum des Fluorochroms muss dazu im Bereich der Laserwellenlänge liegen. Das durch chemische Reaktion oder Antigen-Antikörper-Reaktion aktivierte Fluorochrom absorbiert das Licht dieser Wellenlänge und emittiert Licht einer energieärmeren Wellenlänge. Die emittierte Wellenlänge wird nach Passage des entsprechenden Filters (s. Tabelle 8) durch Photomultiplier gemessen und in elektrisches Signal umgewandelt. Auch hier ist die Signalstärke proportional zur Fluoreszenzaktivität.

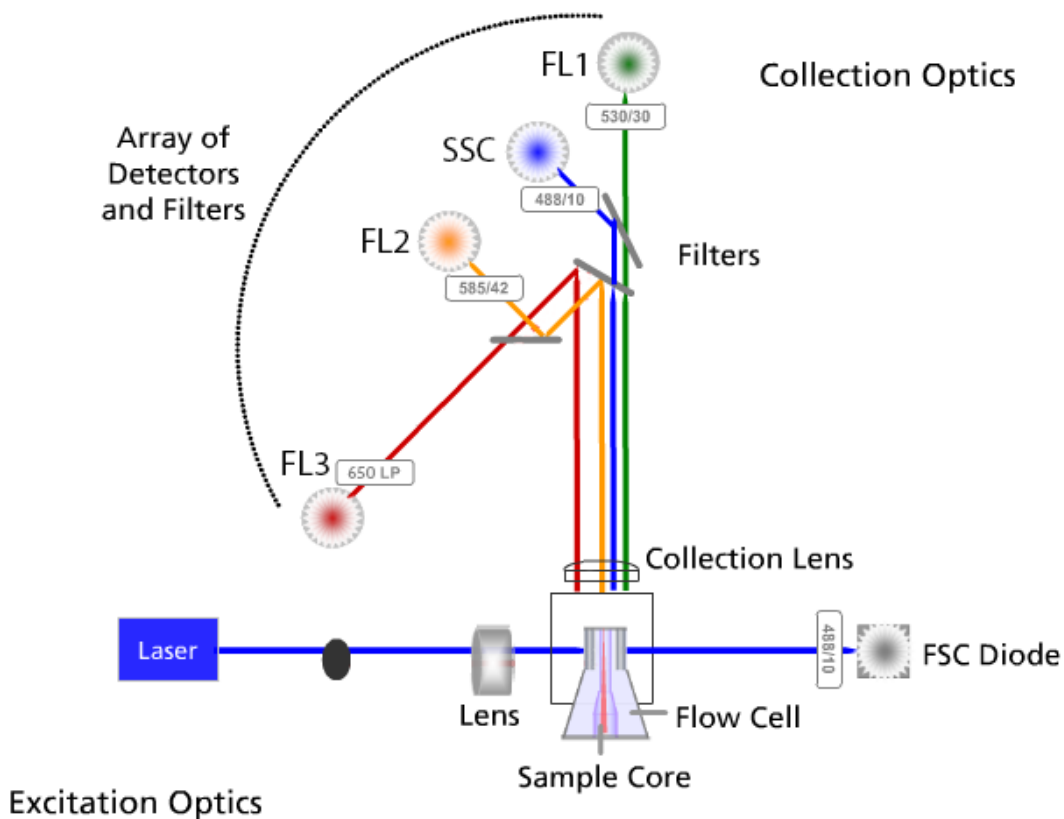


Abbildung 5 Optische Anordnung des FACScan™ modifiziert nach [54]

Es können mehrere Fluorochrome gleichzeitig eingesetzt werden, die alle im Bereich um 488nm absorbieren, deren Emissionsspektren aber keine oder nur geringe Überlappung zeigen. Das für diese Arbeit genutzte FACScan™ kann Fluoreszenzsignale folgender Wellenlängen quantitativ messen:

	Filter	Wellenlängen	Fluorochrom
FL1	530/30 Bandpass	515 – 545nm (grün)	FITC, DHR
FL2	585/42 Bandpass	564 – 606nm (orange)	PE
FL3	650 Longpass	> 650nm (rot)	PerCP

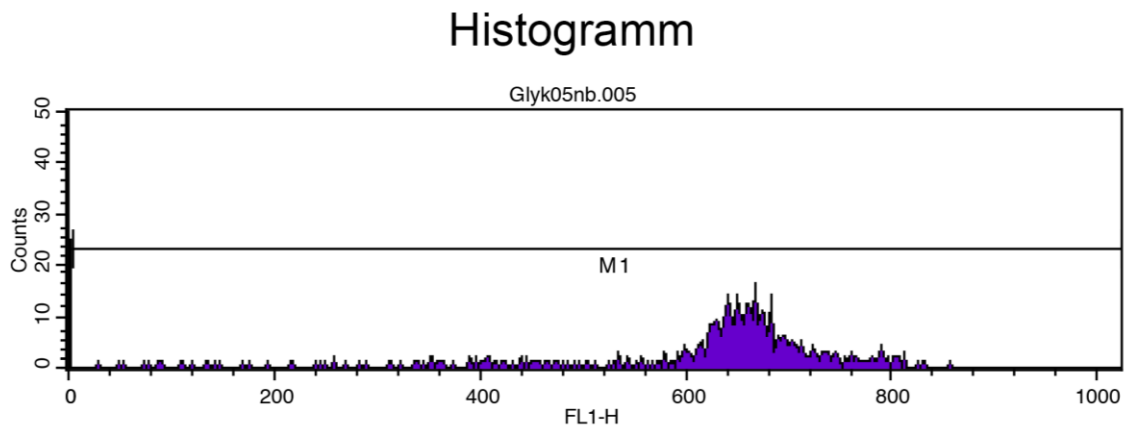
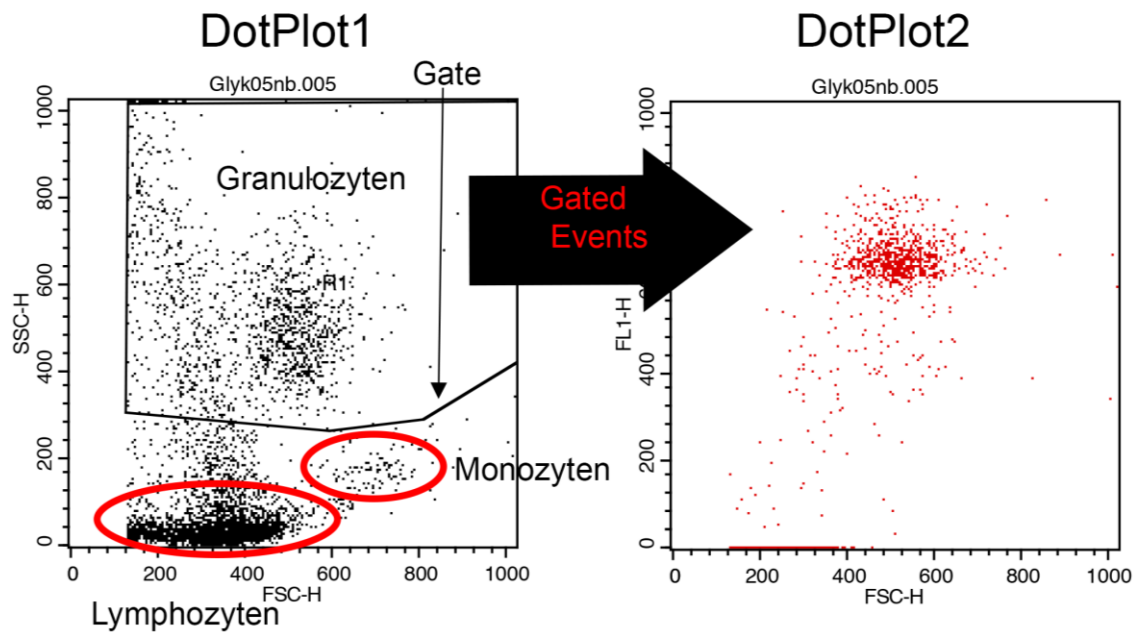
Tabelle 8 Fluoreszenzfilter FACScan™

2.6.2. Messung und graphische Darstellung

Von jeder Zelle werden bei Passage des Analysefensters FSC, SSC und Fluoreszenz (FL1) registriert und durch die Software BD CellQuest™ Pro als ein „Event“ zusammengefasst, das heißt eine Zelle entspricht einem Event. Diese Events werden mit der Software graphisch dargestellt (Abbildung 6) und ausgewertet: DotPlot1 stellt Seitwärtsstreulicht vs. Vorwärtsstreulicht dar, das heißt es wird Zellgranulierung gegen Zellgröße aufgetragen. Jeder Punkt entspricht einer Zelle. Bei Messung von Leukozytrenreichem Plasma lassen sich die unterschiedlichen Leukozytentypen entsprechend ihrer physikalischen Eigenschaften leicht Gruppieren und die - im Falle dieser Studie - untersuchten PMNL (Polymorphonuclear Neutrophilic Leucocytes = Granulozyten) auswählen. Hierzu wird im Programm manuell ein „Gate“ in DotPlot1 um die PMNL gelegt. Dieses dient zur Auswahl der Events (= Zellen), welche in DotPlot2 auf Fluoreszenzaktivität untersucht werden sollen: In DotPlot2 wird die Fluoreszenzintensität (FL1) gegen die Zellgröße (FSC) aufgetragen. Es werden nur die „gegateten“ Zellen aus DotPlot1 dargestellt. Schließlich wird in einem Histogramm die Häufigkeit der Fluoreszenzintensitäten dargestellt. Das arithmetische Mittel („Mean“) wird später zur statistischen Auswertung herangezogen. Sämtliche Werte von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, sowie Fluoreszenzintensität sind dimensionslose Größen und wurden per Konvention zwischen den Herstellern von Durchflusszytometern genormt. Um kleine Partikel wie „Zellschrott“, lysierte Erythrozyten und Thrombozyten von der Analyse auszuschließen, wird im FSC ein Schwellenwert („Threshold“) festgelegt, unterhalb dessen keine Events registriert werden. Die Geräteeinstellungen des FACScan™ sind in Tabelle 9 dokumentiert.

	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3
Voltage	E00	360	360	459	333
Amplifier Gain	1,40	1,00	1,00	1,00	1,00
Data Mode	linear	linear	Log	Log	Log
Threshold	164				
	FL1-FL2	FL2-FL1	FL2-FL3	FL3-FL2	
Compensation	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	

Tabelle 9 Geräteeinstellungen FACScan



Histogram Statistics

File: Glyk05nb.005
 Sample ID: Glyk05nb
 Tube: DHR PMA
 Acquisition Date: 18-Oct-04
 Gated Events: 1350
 X Parameter: FL1-H (Log)

Log Data Units: Channel Values
 Patient ID: Glyk05n
 Panel: DHR Glykokalyx aktuell
 Gate: G1
 Total Events: 5000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	0, 1023	1350	100.00	27.00	413.50	67.16	76.16	625.50	0
M1	4, 1023	886	65.63	17.72	630.05	608.06	19.17	653.00	666

Abbildung 6 Auswertung einer FACS-Analyse (hier: nach Zusatz von PMA und DHR zu LRP)

2.6.3. Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch PMNL & Prinzip der Messung

Nach der Phagozytose von Mikroorganismen durch PMNL kommt es zum so genannten Oxidative Burst, das heißt der Sauerstoffverbrauch der PMNL steigt rapide an, kann sich sogar verdoppeln [55]. Grund dafür ist die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS = Reactive Oxygen Species, ‚Sauerstoffradikale‘), die zum Abbau der Mikroorganismen benötigt werden [56]. Die Produktion von ROS lässt sich als Maßstab für die Stoffwechselaktivität der PMNL heranziehen. In dieser Studie wird dazu der nicht-fluoreszierende, membrangängige Stoff Dihydrorhodamin 123 (DHR 123, MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland) angewendet, der nach Passage der PMNL-Membran durch die reaktiven Sauerstoffspezies zum fluoreszierenden Rhodamin 123 (R 123) oxidiert wird [57]. Es handelt sich hierbei um einen sensitiven Marker, der es erlaubt, das Ausmaß der Stoffwechselaktivierung durch unterschiedliche Stimuli zu differenzieren [58]. Für vorangegangene Studien im Forschungslabor der Klinik für Anaesthesiologie wurde eine Messreihe entwickelt, die PMNL mit unterschiedlichen löslichen Stimuli aktiviert, intern ‚lösliche Reihe‘ genannt. Diese wurde für die vorliegende Studie übernommen. In Tabelle 10 sind die zur Aktivierung der PMNL verwendeten Substanzen, sowie ihre Wirkweise dokumentiert

fMLP	Formylmethionin-Leucyl-Phenylalanin
	chemotaktisches Peptid
	Prokaryonten weisen - im Gegensatz zu Eukaryonten - an der ersten Aminosäurenstelle von Proteinen eine Formylgruppe auf. Diese dient Zellen der Immunabwehr als Erkennungsmerkmal. PMNL sind mit fMLP-Rezeptoren versehen, eine Bindung führt zur intrazellulären Freisetzung von ROS. TNF α verstärkt den Effekt von fMLP
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
	Cytokin
	spielt eine zentrale Rolle bei der Modulation von Immunreaktionen; steigert die Phagozytose, sowie die antikörperinduzierte Toxizität von PMNL gegenüber Mikroorganismen
PMA	Phorbol Mystrate Acetate
	Aktivator der Proteinkinase C
	durch PMA wird via PKC die intrazelluläre Produktion von Zytokinen erhöht.

Tabelle 10 Substanzen zur Aktivierung der PMNL

2.6.4. Gewinnung von Leukozytenreichem Plasma (LRP)

Das leukozytenreiche Plasma wurde mittels spontaner Dichtegradientensedimentation bei Raumtemperatur aus heparinisiertem Vollblut isoliert. Hierzu wurden 3mL Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in ein Sarstedt-Röhrchen (13mL, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) gefüllt. Vorsichtig wurden darauf 3mL

des heparinisierten Blutes aus der Lithium-heparinisierten S-Monovette® (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) pipettiert. Durch den Dichte-Gradienten zwischen Blut- und Histopaque®-Phase sanken die Erythrozyten binnen 30 bis 40min ab und vom Überstand konnte 1mL leukozytenreiches Plasma abpipettiert werden.

2.6.5. Probenherstellung

Die Testsubstanzen Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat waren zuvor in 10 μ L PBS (Phosphate Buffered Saline) in Polypropylen-Mikroreaktionsgefäße aliquotiert und bei –20°C eingefroren worden. Die bei Raumtemperatur aufgetauten Aliquots wurden nun jeweils mit 90 μ L LRP vermischt und für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden daraus die 20 μ L-Testproben hergestellt. Tabelle 11 gibt Übersicht über die Konzentrationen der Testsubstanzen.

	FACS-Röhrchen Nr.	Zielkonzentration K 3	in 10 μ L Aliquot	final in 20 μ L-Probe
Syndecan-1	5	650 ng/mL	60 ng	12 ng
Hyaluronan	6	1800 ng/mL	170 ng	34 ng
Heparansulfat	7	35 μ g/mL	3,0 μ g	0,6 μ g

Tabelle 11 Zielkonzentrationen und Masse der Substanzen in Testproben

Es wurden vier verschiedene Kontrollproben (FACS-Röhrchen 1-4) erstellt, hier wurden dem LRP je eine der in 2.6.3 aufgeführten Substanzen zur Leukozytenaktivierung zugegeben, um später die Intensität der Aktivierung durch die Testsubstanzen einordnen zu können. Um mögliche Fehler durch Verdünnung auszuschließen, wurde das LRP der Kontrollproben mit PBS verdünnt, dazu wurden 450 μ L LRP mit 50 μ L PBS vermischt. Somit enthielten die finalen 20 μ L -Kontrollproben 2 μ L PBS, ebenso wie die Testproben. Nach jedem Arbeitsschritt wurden die Proben mittels Vortex durchmischt. Die Substanzen zur Leukozytenaktivierung der Kontrollproben, sowie der Fluoreszenzmarker Dihydrorhodamin (DHR) lagen bei –80°C gefroren als Stammlösungen vor. Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden sie gemäß Tabelle 12 zu Arbeitslösungen verdünnt.

	Stammlösung (SL)	Arbeitslösung	Zielkonzentration
DHR	1,1mM	100 μ L SL in 900 μ L HBSS	$1,1 \times 10^{-4}M$
TNF	1 μ g/mL	= Stammlösung	1 μ g/mL
fMLP	1mM	10 μ L SL in 990 μ L HBSS	$10^{-5}M$
PMA	1mM	10 μ L SL in 990 μ L HBSS	$10^{-5}M$

Tabelle 12 Zielkonzentrationen der löslichen Stimuli in Testproben

2.6.6. Messreihe zur Aktivierung von PMNL durch lösliche Stimuli

Die in 2.6.5 hergestellten Kontrollproben 1-4, sowie die Testproben 5-7 wurden nun bei 37°C im Wasserbad zu jeweils 1mL HBSS (Hank's Buffered Saline Solution) in die FACS-Röhrchen gegeben. Dazu wurden jeweils 10µL des Fluoreszenzmarkers Dihydrorhodamin (DHR) pipettiert und für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde zu Kontrolle 3 10µL Tumornekrosefaktor alpha (TNF) pipettiert. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation wurden den Kontrollen 2 und 3 jeweils 10µL Formylmethionin-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) und Kontrolle 4 10µL Phorbol-Mystrate-Acetat zugegeben und erneut für 5 Minuten inkubiert. Nun wurden alle Röhrchen dem Wasserbad entnommen und auf Eis gelegt, um sämtliche Reaktionen zu stoppen. Tabelle 13 gibt Übersicht über den Inhalt der einzelnen Falcon Tubes. Nach jedem Schritt wurden die Proben mittels Vortex durchmischt.

Zeit [min]	min.	DHR	DHR fMLP	DHR TNF+ fMLP	DHR PMA	DHR Syndecan-1	DHR Hyaluronan	DHR Heparansulfat		
Nummer		1	2	3	4	5	6	7		
0	0	1mL HBSS								Temperatur 37°C
0	+10	18μL LRP +2μL PBS +10μL DHR				18μL LRP + 2μL Syndecan-1 (650 ng/mL) +10μL DHR	18μL LRP + 2μL Hyaluronan (1800 ng/mL) +10μL DHR	18μL LRP + 2μL Heparansulfat (35 μg/mL) +10μL DHR		
10	+5			10μL TNF						
15	+5		10μL fMLP	10μL fMLP	10μL PMA					
20	+15	auf Eis								

Tabelle 13 Schematische Darstellung der Messreihe

2.7. Rotationsthrombelastometrie

2.7.1. Grundlagen der Rotationsthrombelastometrie

Die Rotationsthrombelastometrie (ROTEM®) ist ein modernes Verfahren zur in-vitro-Gerinnungsanalyse. Es werden Veränderungen der Viskoelastizität im Vollblut gemessen und in Messgrößen sowie graphisch als Thrombelastogramm (TEMogramm) dargestellt [59]. Das für diese Studie verwendete ROTEM® *delta* (Tem International GmbH, München, Deutschland, siehe Abbildung 7) arbeitet mit dem ROTEM®-Verfahren, einer Weiterentwicklung der bereits 1948 durch Hartert beschriebenen Thrombelastographie (TEG®)[60]. Das ROTEM®-Verfahren hat sich in den letzten Jahren aufgrund seiner Benutzerfreundlichkeit und schnellen Aussage über Gerinnungspathologien als Point-of-Care-Messverfahren in der Herzchirurgie und der Notfallmedizin etabliert.



Abbildung 7 ROTEM® delta Point-of-Care-Analysesystem [61]

2.7.2. Messprinzip ROTEM®

Die Viskoelastizität des Vollblutes wird im ROTEM® delta durch einen Sensorstempel erfasst, der - in die Küvette mit Vollblut getaucht - um $\pm 4,75^\circ$ um die eigene Achse rotiert. (vgl. Abbildung 8) Die Rotation wird durch eine Feder ausgelöst, die an einer sich ständig bewegenden Achse aufgehängt ist, welche über weitere Federn insgesamt vier Stempel bewegt. Es können vier Analysen parallel erfolgen. Der Stempel ist oberhalb der Feder mit einem Spiegel versehen. Eine fest installierte LED-Lichtquelle sendet Licht auf den Spiegel und ein ebenfalls fest installierter Detektor misst die Reflexion. Kommt das Blut in der Küvette nun zur Gerinnung, wird die Rotation des Stempels sukzessive eingeschränkt. Die verminderte Rotation wird durch Veränderungen der Reflexion detektiert und zur Datenverarbeitung an den Computer weitergeleitet. Küvette und Probe befinden sich in einem beheizten Küvettenhalter, um die Gerinnungssituation bei Körpertemperatur zu simulieren.

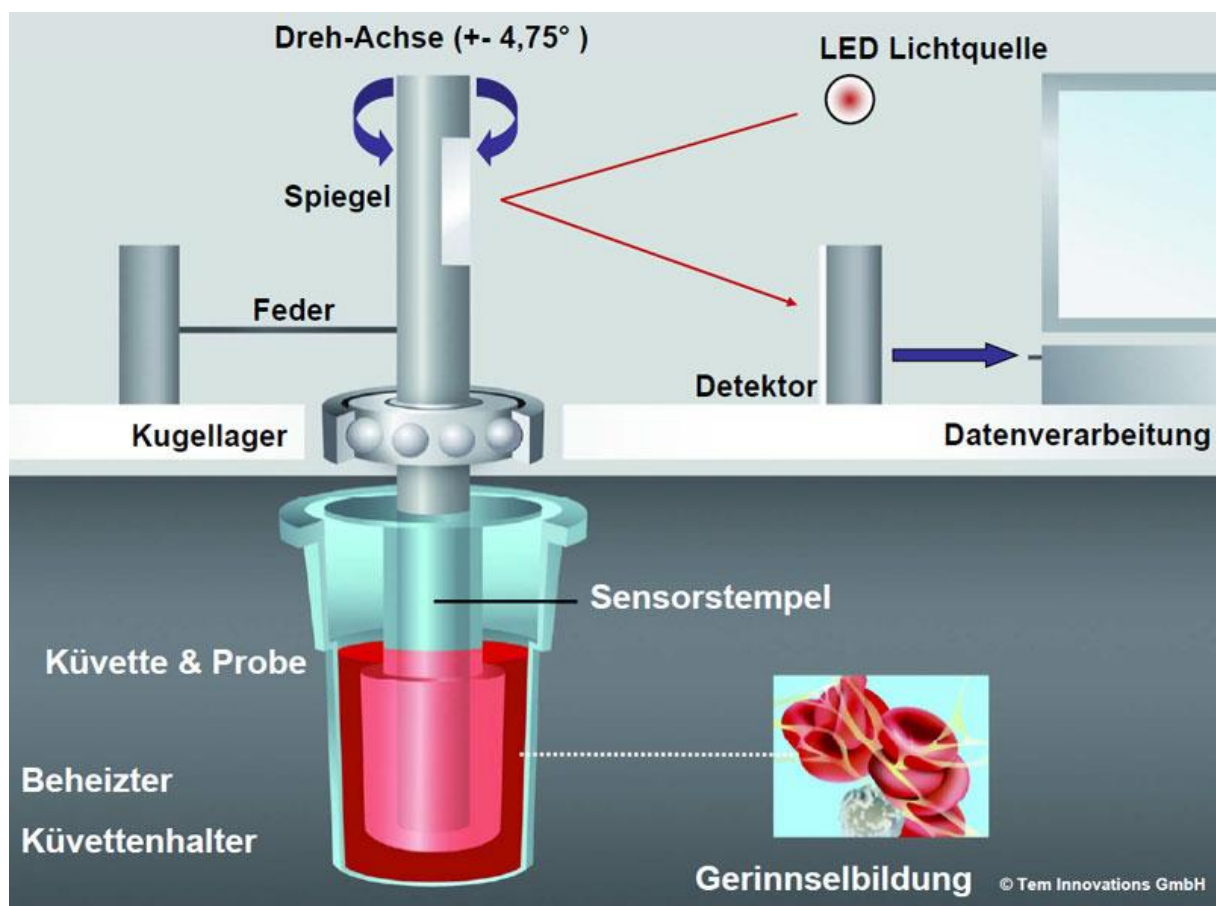


Abbildung 8 Messprinzip ROTEM [61]

2.7.3. ROTEM®-Ansätze

Wie auch für die hämostaseologischen Globaltests, wurde dem Probanden zunächst Vollblut in Citrat-Monovetten entnommen. Allerdings konnte dieses direkt für die ROTEM®-Analysen verwendet werden, eine Herstellung von thrombozytenarmem Plasma erfolgte nicht. Analog zu den hämostaseologischen Globaltests kann die Gerinnung im ROTEM® über den extrinsischen (Gewebsthromboplastin) und intrinsischen (Oberflächenaktivatoren) Weg aktiviert werden.

2.7.3.1. EXTEM

Zur Simulation des extrinsischen Gerinnungsweges (Globaltest TPZ/Quick/INR) wurden in der Messküvette zunächst 20 μL des star-tem® Reagenz (alle tem® Reagenzien: Tem International GmbH, München, Deutschland) vorgelegt, es dient der Rekalkifizierung der Probe. Anschließend wurden 20 μL r ex-tem® Reagenz hinzu pipettiert, es enthält rekombinantes humanes Gewebsthromboplastin zur Gerinnungsaktivierung. Zuletzt wurden 300 μL des Citrat-Vollbluts hinzu pipettiert und zweimal mit der Pipette gemischt. Die Messung wurde gestartet.

2.7.3.2. INTEM

Zur Simulation des intrinsischen Gerinnungsweges (Globaltest aPTT) wurden erneut 20 μL des star-tem® Reagenz zur Rekalkifizierung vorgelegt, anschließend wurden 20 μL des in-tem® Reagenz hinzu pipettiert, es enthält partielles Thromboplastin-Phospholipid aus Kaninchenhirn und Ellagsäure zur Gerinnungsaktivierung. 300 μL des Citrat-Vollbluts wurden hinzu pipettiert und zweimal mit der Pipette gemischt. Die Messung wurde gestartet.

2.7.3.3. HEPTEM

In der klinischen Anwendung von ROTEM®-Analysen ist es elementar, den Einfluss von Heparin auf die intrinsische Gerinnung zu kennen. Zu diesem Zweck wurde die HEPTEM-Methode entwickelt: Anstelle des star-tem® Reagenz wurden 20 μL hep-tem® Reagenz vorgelegt. Es enthält Heparinase, die eventuell vorhandenes Heparin spaltet und inaktiviert. Die Rekalkifizierung erfolgt durch im hep-tem® Reagenz enthaltenes Calcium. Anschließend wurden 20 μL in-tem® Reagenz hinzu pipettiert und nach Zugabe von 300 μL Citrat-Vollblut und zweimaligem Mischen wurde die Messung gestartet. Ein Heparin-Einfluss auf die Gerinnung ließ sich durch Vergleich der HEPTEM-Messung mit der INTEM-Messung erkennen. Für die vorliegende Studie wurde die HEPTEM-Messung angewendet, um etwaige heparinartige Effekte der Glykokalyx-Bestandteile Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluronan zeigen zu können. Das hep-tem® Reagenz wird vom Hersteller separat als

aufzulösendes Pulver (hep-tem® Lyo), welches Heparinase I enthält und als Lösungsmittel (hep-tem® Dil) geliefert, das neben Calcium-Ionen auch Natriumazid enthält. Das fertige Reagenz wurde täglich neu hergestellt: 200 μL hep-tem® Dil wurden zu hep-tem® Lyo pipettiert und anschließend durch vorsichtiges Schwenken vermischt.

2.7.3.4. FIBTEM

Während die hämostaseologischen Globaltests allein den plasmatischen Anteil der Gerinnung abdecken, schließen ROTEM®-Analysen im Vollblut auch den thrombozytären Anteil mit ein. Um Aussagen zur Fibrinogenkonzentration und Qualität der Fibrinpolymerisation treffen zu können, müssen die Thrombozyten ausgeschaltet werden. Dazu wurden 20 μL fib-tem® Reagenz vorgelegt. Es enthält Cytochalasin D zum Abtöten der Thrombozyten, sowie CaCl_2 zur Rekalzifizierung. Anschließend wurden 20 μL r ex-tem® Reagenz hinzu pipettiert und nach Zugabe von 300 μL Citrat-Vollblut und zweimaligem Mischen die Messung gestartet. Um den Anteil der Thrombozyten an der Gerinnungsbildung zu beurteilen, wurden die Ergebnisse der FIBTEM- und EXTEM-Tests verglichen.

2.7.4. graphische Darstellung und Auswertung

Die von der ROTEM® Software erstellte Reaktionskurve trägt die Gerinnungsfestigkeit gegen die Zeit in Minuten auf. Die Gerinnungsfestigkeit ist dabei die graphische Amplitude, die gemäß Tabelle 14 aus der Rotationsamplitude des Stempels umgerechnet wird. Dabei werden Störungsfilter und mathematische Algorithmen zur Kurvenglättung angewendet. Durch mathematische Analyse der Kurve werden unterschiedliche Parameter zur Festigkeit und Gerinnungsdauer ermittelt.

"	graphische Amplitude in [mm]	Rotation des Stempels	Gerinnung
	0	freie Rotation des Stempels	keine Gerinnung
	100	keine Rotation des Stempels	maximal mögliche Festigkeit des Gerinnsels
"			

Tabelle 14 Umrechnung der Rotationsamplitude des Stempels in graphische Amplitude laut Hersteller [62]

Abbildung 9 zeigt ein TEMogramm und veranschaulicht wichtige Parameter, die im folgenden kurz definiert werden sollen.

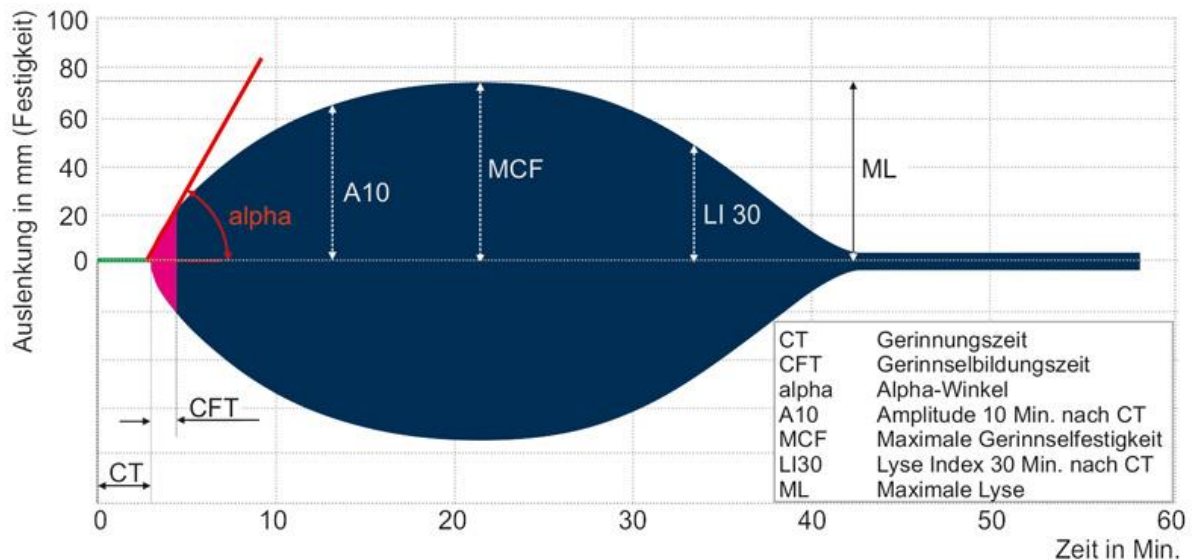


Abbildung 9 TEMogramm: graphische Darstellung der Thromboelastometrie in Echtzeit [63]

2.7.4.1. *CT = Clotting Time = Gerinnungszeit [s]*

„Die CT ist die Zeit vom Start eines Tests durch Zugabe des Gerinnungsaktivators bis zu dem Zeitpunkt, an dem eine 2 mm Amplitude erreicht ist.“[62] Die CT beschreibt die Zeit bis zur Fibrinbildung und ist damit analog zu den hämostaseologischen Globaltests zu sehen. Die Zeiten sind jedoch nicht identisch, da mehr Fibrin gebildet und vernetzt werden muss, um die Rotation des Stempels einzuschränken und damit die erforderliche 2 mm Amplitude zu erreichen.

2.7.4.2. *CFT = Clot Formation Time = Gerinnselfestigkeitszeit [s]*

„Die CFT ist die Zeit, die vergeht zwischen einer 2 mm und einer 20 mm Amplitude des Gerinnselfestigkeitssignals.“ [62]

2.7.4.3. *alpha = Alpha-Winkel [°]*

„Der Alpha-Winkel ist definiert als der Winkel zwischen der Mittellinie und der Tangente an die Gerinnungskurve durch den 2 mm Amplitudenpunkt. Er beschreibt die Kinetik der Gerinnselfestigung.“ [62]

2.7.4.4. *A10 = Amplitude 10min nach CT [mm]*

Der A10-Wert ist ein Maß für die Festigkeit des Gerinnselfestigkeitssignals und damit die Gerinnselfestigkeitsqualität 10 min nach CT. Er wird als Amplitude in mm angegeben. [62]

**2.7.4.5. MCF = Maximum Clot Firmness = Maximale Gerinnselfestigkeit
[mm]**

Die Maximale Gerinnselfestigkeit MCF ist ein Maß für die Qualität des Gerinnsels. Sie ist definiert als die maximale Amplitude in *mm*, bevor das Gerinnsel durch Fibrinolyse wieder an Amplitude verliert. MCF und A10 werden im klinischen Kontext zur Beurteilung der Gerinnselqualität und als Entscheidungshilfe zur Substitution von Fibrinogen oder Frischplasma herangezogen. Eine erhöhte MCF weist auf Hyperkoagulabilität hin. [62]

2.7.4.6. ML = Maximale Lyse [%]

Die Maximale Lyse ist die Abnahme der Amplitude der Gerinnselfestigkeit bis Ende der Messung im Verhältnis zur MCF in [%]. [62]

$$ML = \frac{MCF - A60}{MCF} \times 100\%$$

Im Falle dieser Studie wurde die Messung immer 60 *min* nach CT beendet, daher geht die Amplitude 60 *min* nach CT, A60, in die Kalkulation ein. Die maximale Lyse gibt Aufschluss über eine mögliche Hyperfibrinolyse.

2.7.5. Probenherstellung

Die zwei 10 *mL*-Citrat-Monovetten wurden mit Parafilm abgedichtet und im Wasserbad bei 37°C aufbewahrt. Vorversuche hatten gezeigt, dass die Aktivierbarkeit des Citratblutes nach Lagerung bei Raumtemperatur bereits nach ca. 2 *h* zurückging, bei Lagerung unter Körpertemperatur bis zu 8 *h* konstant blieb. Die in 2.3 hergestellten und bei -20 °C konservierten Aliquots wurden wenige Minuten vor der jeweiligen Messung auf Raumtemperatur aufgetaut. Dann wurde zum entsprechenden 10 μ L-Aliquot 290 μ L Citrat-Vollblut pipettiert und einmal mit der Pipette gemischt. Zu diesem Zweck wurde eine der Citrat-Monovetten kurz dem Wasserbad entnommen, nach Entnahme der 290 μ L Citrat-Vollblut mit frischem Parafilm abgedichtet und zurück ins Wasserbad gelegt. Die fertigen Testproben wurden für 5 *min* bei 37°C inkubiert und anschließend der Messung zugeführt. Um Verdünnungseffekte auszuschließen, wurde für die Kontrollmessung 10 μ L PBS zu 290 μ L Citrat-Vollblut pipettiert. Tabelle 15 gibt Übersicht über die entsprechenden Konzentrationen:

	Konzentration	Zielkonzentration	in 10 μ L Aliquot = final in 300 μ L-Probe
Syndecan-1	K 1	180 ng/mL	54 ng
	K 2	480 ng/mL	144 ng
	K 3	650 ng/mL	195 ng
Hyaluronan	K 1	400 ng/mL	120 ng
	K 2	700 ng/mL	210 ng
	K 3	1800 ng/mL	540 ng
Heparansulfat	K 1	18 μ g/mL	5,4 μ g
	K 2	25 μ g/mL	7,5 μ g
	K 3	35 μ g/mL	10,5 μ g

Tabelle 15 Zielkonzentrationen und Masse der Testsubstanzen in den Testproben

Es wurden ROTEM®-Analysen der in Tabelle 16 dargestellten Proben durchgeführt. Die Ansätze EXTEM, INTEM, HEPTM und FIBTEM einer Probe wurden jeweils parallel gemessen. Die Messungen liefen über den vom Hersteller definierten Maximalzeitraum, das heißt CT plus 60 min.

Probe		Tests
Kontrolle	verdünntes Vollblut	jeweils EXTEM, INTEM, HEPTM & FIBTEM
Heparansulfat	K 1	
	K 2	
	K 3	
Syndecan-1	K 1	
	K 2	
	K 3	
Hyaluronan	K 1	
	K 2	
	K 3	

Tabelle 16 Analyse-Schema ROTEM®-Analysen

2.8. Materialverzeichnis

	Eigenschaften/ Zusammensetzung	Hersteller
Geräte		
FACScan™	Durchflusszytometer mit 488nm Argon-Laser	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
ROTEM® delta	System zur Rotationsthrombelastometrie inkl. elektronischer Systempipette	Tem International GmbH, München, Deutschland
Wasserbad		
Hettich Zentrifuge EBA 20		Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
BCS® XP System	Hochgeschwindigkeits-Gerinnungsanalyse-System zur Bestimmung der klassischen Gerinnungsparameter; Analysen durchgeführt durch Mitarbeiter der Instituts für Laboratoriumsmedizin	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland

Pipetten		
Eppendorf Multipette M4		Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Reference		
Eppendorf Research Plus		

Testsubstanzen		
Syndecan-1/CD138	rekombinantes humanes Syndecan-1/CD138	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Hyaluronsäure	Hyaluronsäure Natriumsalz aus Hahnenkamm	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Heparansulfat	Heparansulfat Natriumsalz aus boviner Niere	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Arbeitslösungen		
Histopaque®-1077	sterile solution of polysucrose, 57 g/L, and sodium diatrizoate, 90 g/L. Density: 1.076–1.078 g/mL; Endotoxin: $\leq 0.3 \text{ EU/mL}$; pH: 8.8–9.0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
HBSS	Hank's Buffered Saline Solution „Hank'sche Lösung ohne Phenolrot“ 500mL Zusammensetzung: Natriumchlorid 8,0g; Kaliumchlorid 0,4g; Magnesiumsulfat-Heptahydrat 0,07g; Magnesiumchlorid-Hexahydrat 0,07g; Calciumchlorid-Dihydrat 0,13g; di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 0,15g; Kaliumdihydrogenphosphat 0,06g; Glucose-Monohydrat 1,0g; Natriumhydrogencarbonat 0,3g; Wasser für Injektionszwecke zu 1000,0g	Apotheke Klinikum der Universität München, München, Deutschland
PBS	Phosphate Buffered Saline 100mL pH 7,4; Na^+ 171 mmol/L; K^+ 1,7 mmol/L Inhalt: Natriumchlorid 9,0g; Kaliumdihydrogenphosphat 0,23g; Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 1,48g; Wasser für Injektionszwecke zu 1000,0mL; filtriert über 0,2µM, sterilisiert	Apotheke Klinikum der Universität München, München, Deutschland

Reagenzien zur Durchführung der Globaltests der plasmatischen Gerinnung		
Thromborel® S (Calciumhaltiges Human-Thromboplastin)	Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick Zusammensetzung: lyophilisiertes Thromboplastin aus Human-Plazenta, Calciumchlorid, Stabilisatoren Konservierungsmittel: Gentamicin (0,1 g/l), 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazol-3-on und 2-Methyl-4-isothiazol-3-on (< 15 mg/l)	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland
Dade® Actin® FSL Reagenz zur Bestimmung der aPTT	Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit Zusammensetzung: Gereinigte Sojabohnen- und Kaninchenhirn-Phospholipide in $1,0 \times 10^{-4} M$ Ellagsäure, gepuffert, stabilisiert und konserviert.	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany
BC-Thrombin-Reagenz	Bestimmung der Thrombinzeit Zusammensetzung: BC-Thrombin-Reagenz lyophilisiert: Thrombin vom Rind ($\leq 0,8$ IU/ml), Albumin vom Rind Pufferlösung für BC-Thrombin-Reagenz: HEPES, pH 7,4 Konservierungsmittel: 5-Chlor-2-methyl-isothiazol-3-on (6 mg/l) und 2-Methyl-isothiazol-3-on (2 mg/l)	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Germany
Calciumchlorid-Lösung	$CaCl_2$ -Lösung 0,025M	

FACS-Reagenzien		
DHR	Dihydrorhodamine 123 Für eine 1,1 mM-Stammlösung von DHR (MG 346 g/mol) werden 10 mg in 26,2 ml DMF ² gelöst. Die Lsg wird in 100 µl Portionen abgefüllt und bei -20° C tiefgefroren (Stabilität > 12 Monate, Lösung bei Verfall orange Farbe). Abfüllung in braune 1,5 ml Eppis. → Konz $1,1 \times 10^{-3} M$	MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland
TNF	Tumor necrosis factor α Die Originalsuspension wird mit 9 ml (PBS ⁵ + 0.1% BSA ⁶) ²⁶ verdünnt. Die Lösung wird in 200 µl Portionen abgefüllt und bei -20° C tiefgefroren (Stabilität > 12 Monate). Abfüllung in weiße 1,5 ml Eppis. → Konz. 1 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
fMLP	N-Formyl-methionyl-L-leucyl-L-Phenylalanin Für eine 1 mM-Stammlösung von fMLP (MG 437,6 g/mol) werden 50 mg in 114,3 ml DMF ² gelöst. Die Lsg wird in 500 µl Portionen abgefüllt und bei -20° C tiefgefroren (Stabilität > 60 Monate). Abfüllung in weiße 1,5 ml Eppis → Konz $10^{-3} M$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate Für eine 1 mM-Stammlösung von PMA (MG 616,8 g/mol) werden 1 mg in 1,62 ml DMF ² gelöst. Die Lsg wird in 10 µl Portionen abgefüllt und bei -20° C tiefgefroren (Stabilität > 6 Monate). Abfüllung in weiße 1,5 ml Eppis. → Konz $10^{-3} M$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

ROTEM®-Reagenzien		
star-tem®	0,2 mol/l CaCl ₂ in HEPES Puffersubstanz pH 7,4 und 0,1 % Natriumazid in Glasflaschen	Tem International GmbH, München, Deutschland
in-tem®	Partielles Thromboplastin-Phospholipid aus Kaninchenhirn (Chloroform-Extrakt), Ellagsäure, Puffersubstanz, Konservierungsmittel in kleinen Glasfläschchen	
hep-tem®		
• hep-tem® Lyo	Heparinase I aus Flavobakterien, Puffersubstanz, Konservierungsmittel in kleinen Glasfläschchen mit Gefriertrocknungs-Stopper und Schraubverschluss.	
• hep-tem® Dil	Calcium-haltiges Verdünnungsmittel und Start-Reagenz mit Natriumazid (NaN ₃ <0.1%) und Konservierungsmittel in kleinen Glasfläschchen	
rex-tem®	Rekombinantes Gewebethromboplasmin und Phospholipide, Heparin-Inhibitor, Konservierungsmittel und Puffersubstanz in kleinen Glasfläschchen.	
fib-tem®	Cytochalasin D / DMSO Lösung 0,2 mol/l CaCl ₂ in HEPES Puffersubstanz pH 7,4, Konservierungsmittel in Glasflaschen	

Einmalartikel		
Reagiergefäß 1,5 mL		Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
BD Falcon™	5mL Polypropylene Round-Bottom Tube „FACS-Röhrchen“	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen	Unterschiedliche Pipettenspitzen	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wessling-Berzdorf, Deutschland
Mutifly®-Set	„Butterfly“ zur Blutentnahme	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette®	<ul style="list-style-type: none"> • 3mL 9NC (Coagulation) • 10mL 9NC (Coagulation) • 9mL Lithium-Heparin • 9mL Z-Gel (Serum) 	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Software		
ROTEM® delta 1.6.0		Tem International GmbH, München, Deutschland
BD CellQuest™ Pro 4.0.2		Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
SigmaPlot 12,5 & 13		Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland
Microsoft Office 2010 & 2011/2016 (Mac)		Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Think-cell		think-cell Sales GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland

2.9. Statistik

Die Ergebnisse der Messungen der hämostaseologischen Globaltests und der Durchflusszytometrie wurden händisch in Excel-Tabellen eingetragen. Die Ergebnisse der ROTEM®-Analysen wurden als Textdatei aus der Software des ROTEM® delta exportiert und per Text-to-Table-Funktion in Microsoft® Excel importiert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden in Microsoft Excel 2010 und 2011 für Mac (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) mit den Funktionen „MITTELWERT“, „MITTELWERTWENN“ und „STABW.N“ berechnet. Zur statistischen Analyse wurde SigmaPlot 12.5 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) verwendet.

Hierbei wurden die Daten nach Shapiro-Wilk auf Normalverteilung überprüft. Anschließend wurde, wenn die Daten normalverteilt waren, eine Repeated Measures Analysis of Variance (RM ANOVA) durchgeführt und nach Holm-Sidak die Signifikanz gegenüber dem Kontrollwert untersucht. Daten, die nicht normalverteilt vorlagen, wurden mit einer Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks untersucht, signifikante Unterschiede zum Kontrollwert wurden nach Dunnett berechnet. Für $p < 0,05$ wurde ein Unterschied als „signifikant“ gewertet, für $p < 0,01$ als „hoch signifikant“. Die Ergebnisse wurden mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Probandengruppe

Im Zeitraum von 2 Monaten wurden 10 männliche Probanden untersucht. Das mittlere Alter der Teilnehmer betrug $27,2 \pm 3,3$ Jahre. Die Probanden waren mit einer durchschnittlichen Körpergröße von $1,81 \pm 0,06$ m bei einem durchschnittlichen Gewicht von $76,8 \pm 11,1$ kg und damit einem durchschnittlichen Body Mass Index von $23,40 \pm 2,61 \frac{kg}{m^2}$ normalgewichtig. Vier der zehn Probanden litten unter leichtem allergischen Asthma, vier unter unterschiedlichen Allergien. Zwei der Probanden hatten in der Vorgeschichte traumatische Frakturen, ein Proband litt unter arterieller Hypertonie. Tabelle 17 gibt Übersicht über die Daten der einzelnen Probanden Glyk-1 bis Glyk-10.

	Alter [a]	Größe [m]	Gewicht [kg]	BMI [$\frac{kg}{m^2}$]	Allergien	Allergisches Asthma	Andere Er- krankungen
Glyk-1	24	1,80	70	21,60	Pollen	+	-
Glyk-2	27	1,75	74	24,16	-	+	-
Glyk-3	23	1,85	86	25,13	-	-	-
Glyk-4	27	1,75	75	24,49	-	-	-
Glyk-5	25	1,89	105	29,39	-	-	-
Glyk-6	25	1,90	74	20,50	Hausstaub	-	-
Glyk-7	28	1,72	68	22,99	Katzen, Pollen, Gräser	+	-
Glyk-8	32	1,82	69	20,83	Katzen, Pollen, Äpfel, Nüsse	+	-
Glyk-9	28	1,77	72	22,98	-	-	-
Glyk-10	33	1,85	75	21,91	-	-	Arterielle Hypertonie
MW	27,2	1,81	76,8	23,40			
SD	3,3	0,06	11,1	2,61			

Tabelle 17 gibt Übersicht über den Gesundheitszustand der Probandengruppe, sowie Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) von Alter, Größe, Gewicht und BMI

3.2. Hämostaseologische Globaltests

Die Ergebnisse der hämostaseologischen Globaltests wurden über die Befundungssoftware im Intranet des Klinikums der Universität München abgerufen. Die Werte der Kontrollproben lagen für alle Probanden im Normbereich: durchschnittlich lag die Thromboplastinzeit nach Quick bei $84 \pm 8 \%$ und die International Normalized Ratio (INR) bei $1,1 \pm 0,1$. Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit lag bei $28 \pm 2 \text{ s}$, die aPTT-Ratio bei $1,0 \pm 0,1$ und die Thrombinzeit bei $20 \pm 2 \text{ s}$. Die Testproben, die zuvor mit K3 der Testsubstanzen Syndecan-1 bzw. Hyaluronan inkubiert worden waren, wiesen für keinen der Testparameter signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben auf. Die mit Heparansulfat der Konzentration K3 inkubierten Testproben unterschieden sich in Quick und INR ebenfalls nicht signifikant von den Kontrollproben. Die Werte der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit ($55 \pm 10 \text{ s}$), der aPTT-Ratio ($2,0 \pm 0,4$) sowie der Thrombinzeit ($146 \pm 14 \text{ s}$) waren gegenüber den Kontrollproben signifikant erhöht ($p < 0,05$). In Tabelle 18 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen sämtlicher Globaltests dargestellt. Die Balkendiagramme in Abbildung 10 dienen der graphischen Veranschaulichung.

	Kontrolle	Heparansulfat	Syndecan-1	Hyaluronan	Signifikanz
	<i>MW \pm SD</i>	<i>MW \pm SD</i>	<i>MW \pm SD</i>	<i>MW \pm SD</i>	(ANOVA)
Quick [%]	84 ± 8	83 ± 9	82 ± 9	83 ± 9	n. s.
INR	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	n. s.
aPTT [s]	28 ± 2	55 ± 10	27 ± 2	28 ± 2	$p < 0,05$
aPTT-Ratio	$1,0 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$p < 0,05$
TZ [s]	20 ± 2	146 ± 14	20 ± 1	21 ± 2	$p < 0,05$

Tabelle 18 zeigt Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der hämostaseologischen Globaltests der Kontrollproben und der mit Testsubstanzen Heparansulfat, Syndecan-1 und Hyaluronan der Konzentrationen K3 inkubierten Testproben, sowie die Signifikanz der Unterschiede (N = 10)

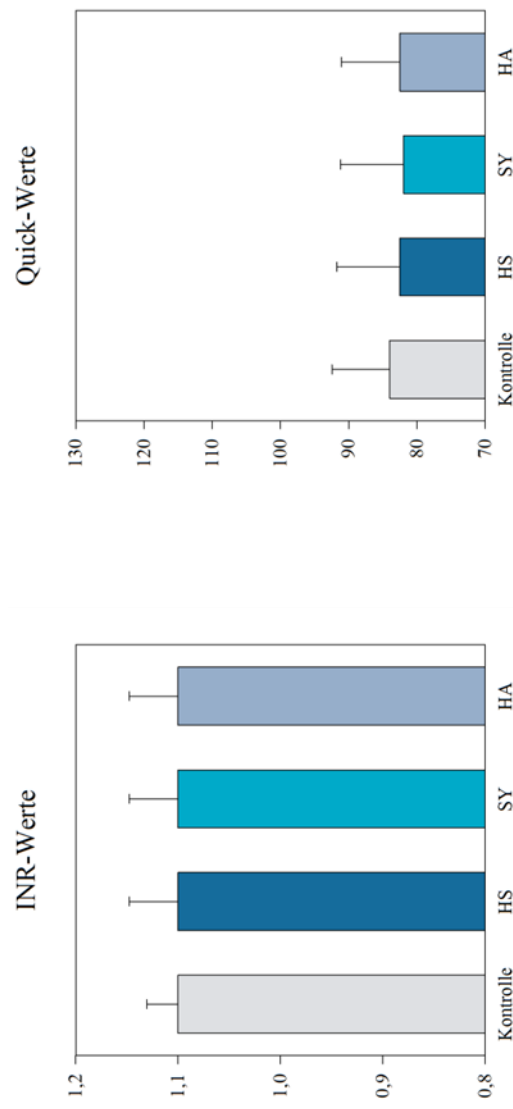
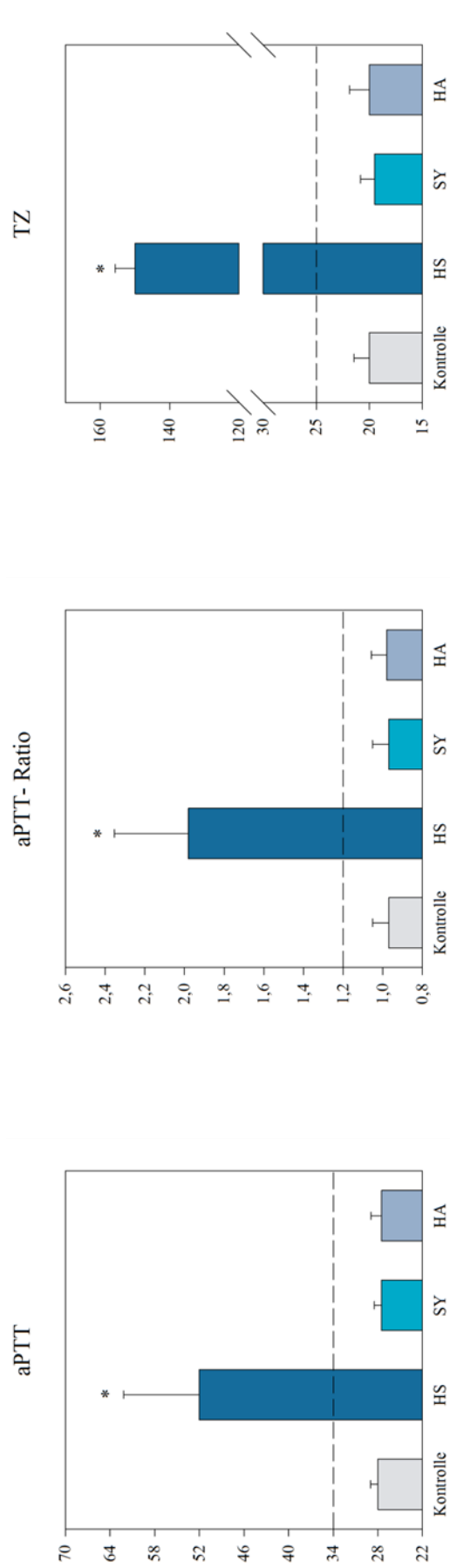


Abbildung 10 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der hämostaseologischen Globaltests der Kontrollproben und der mit Testsubstanzen Heparansulfat (HS), Syndecan-1 (SY) und Hyaluronan (HA) der Konzentrationen K3 inkubierten Testproben. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert (N = 10). Die Skalierungen entsprechen den vom Institut für Laboratoriumsmedizin angegebenen Referenzbereichen, wenn diese zur Darstellung nicht ausreichen, wurde die Obergrenze als gestrichelte Linie eingezeichnet.

3.3. Durchflusszytometrie

Die Fluoreszenz-Mittelwerte zur Aktivierung von PMNL wurden aus den Ergebnisseiten der BD CellQuest™ Pro Software abgelesen und händisch in Microsoft Excel eingetragen. Dort wurden sie zur statistischen Analyse für SigmaPlot 12.5 sortiert. Die Daten wurden nach Shapiro-Wilk auf Normalverteilung untersucht. Da diese für alle Datenreihen vorlag, wurde eine Repeated Measures Analysis of Variance (RM ANOVA) durchgeführt und nach Holm-Sidak die Signifikanz gegenüber dem Kontrollwert untersucht. Für die Kontrollproben mit fMLP, TNF α & fMLP sowie PMA zeigte sich eine gesteigerte Fluoreszenz, für TNF α & fMLP und PMA war diese hochsignifikant ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle. Die Testproben mit Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat zeigten keine signifikant erhöhte Fluoreszenz. Die genauen Werte sind in Tabelle 19 dargestellt, Abbildung 11 dient der graphischen Veranschaulichung.

Datentabelle Durchflusszytometrie

	MW	SD	p
Kontrolle	161,4	78,4	
fMLP	226,3	72,7	0,107
TNF & fMLP	282,1	72,7	< 0,001
PMA	435,2	127,6	< 0,001
Syndecan-1	167,2	81,7	0,961
Hyaluronan	174,2	78,6	0,978
Heparansulfat	179,5	100,7	0,977

N = 10 Probanden, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

Tabelle 19 zeigt Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Kontrolle, die Kontrollproben, welche zu einer Aktivierung führen sollten (fMLP, TNF & fMLP, PMA), sowie die mit den Testsubstanzen Heparansulfat, Syndecan-1 und Hyaluronan der Konzentrationen K3 inkubierten Testproben. Der p-Wert gibt die Signifikanz gegenüber der Kontrolle an (N = 10)

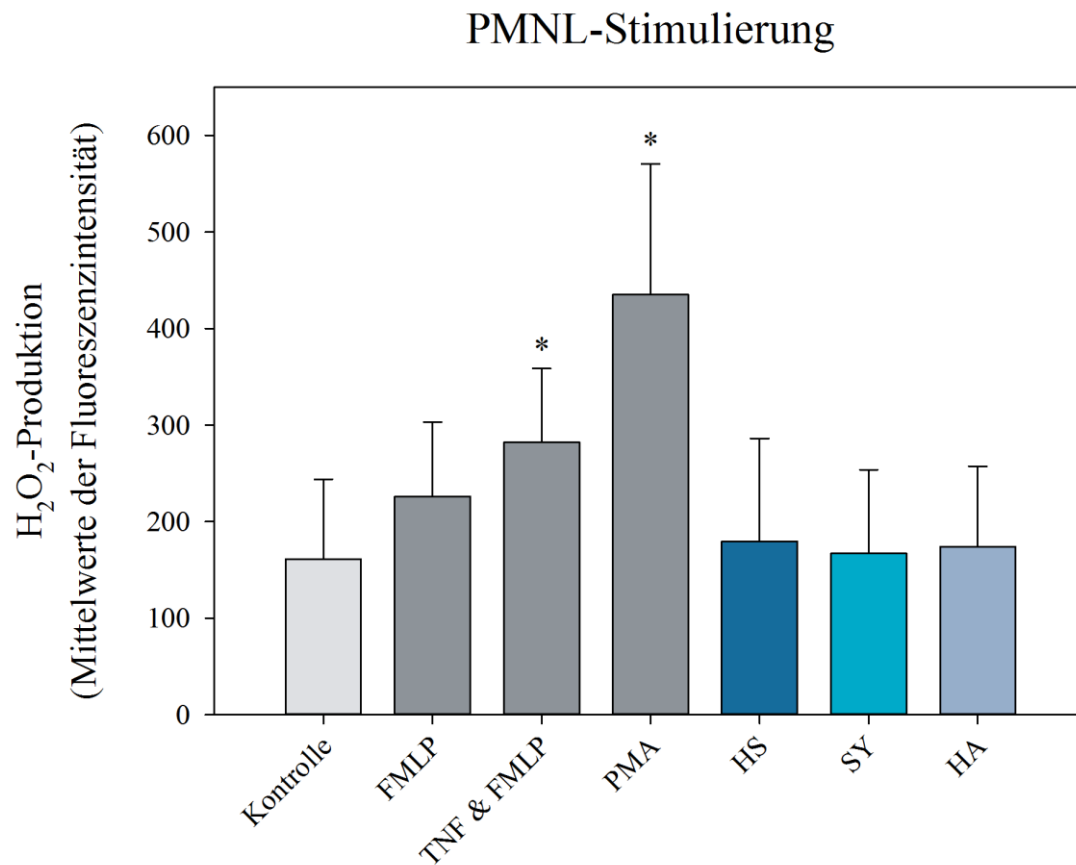


Abbildung 11 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Kontrolle, die Kontrollproben, welche zu einer Aktivierung führen sollten (FMLP, TNF & FMLP, PMA), sowie die mit den Testsubstanzen Heparansulfat (HS), Syndecan-1 (SY) und Hyaluronan (HA) der Konzentrationen K3 inkubierten Testproben. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit * markiert (N = 10, * p < 0,001)

3.4. Rotationsthrombelastometrie

3.4.1. EXTEM

3.4.1.1. EXTEM Kontrollproben

Die Kontrollproben der Probanden lagen im Mittelwert für alle gemessenen Parameter im vom Hersteller definierten Referenzbereich (siehe 6.3 Referenzwerte ROTEM®).

3.4.1.2. EXTEM Heparansulfat

Die Clotting Time (CT) nahm mit steigenden Konzentrationen von Heparansulfat leicht ab von $64,4 \pm 16,0$ s für die Kontrollproben bis auf $55,8 \pm 9,6$ s für Heparansulfat der Konzentration K3. Für keine der Konzentrationen K1, K2 und K3 konnte eine Signifikanz im Vergleich zur Kontrollprobe gezeigt werden. Die Clot Formation Time (CFT) zeigte einen deutlichen kontinuierlichen Anstieg mit steigenden Heparansulfat-Konzentrationen. Sie lag bei $96,2 \pm 15,4$ s für die Kontrollproben und stieg bis auf $129,1 \pm 19,7$ s für K3. Dabei war die Verlängerung der CFT für Heparansulfat der Konzentrationen K2 und K3 signifikant. Der Alphawinkel flachte mit steigenden Heparansulfat-Konzentrationen ab, von $70,7 \pm 3,1^\circ$ der Kontrolle auf $65,2 \pm 3,9^\circ$ für K3. Signifikant war diese Veränderung für die Konzentrationen K2 und K3 im Vergleich zu den Kontrollproben. Die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) nahm mit steigenden Konzentrationen von Heparansulfat kontinuierlich ab von $54,4 \pm 5,1$ mm der Kontrolle auf $47,7 \pm 5,5$ mm für K3. Auch hier waren die Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle für die Konzentrationen K2 und K3 signifikant. Auch die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) nahm mit steigenden Konzentrationen kontinuierlich ab von $61,4 \pm 4,8$ mm der Kontrolle auf $55,6 \pm 5,5$ mm für K3. Wiederum zeigte sich eine Signifikanz für K2 und K3 im Vergleich zur Kontrolle. Die maximale Lyse (ML) blieb für alle Konzentrationen nahezu konstant. Die Diagramme in Abbildung 12 auf Seite 50 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

3.4.1.3. EXTEM Syndecan-1

Die Clotting Time (CT) war für die Syndecan-1-Konzentrationen K1, K2 und K3 gegenüber den Kontrollproben leicht verkürzt. Die längste CT wiesen hier die Kontrollproben mit $64,4 \pm 16,0$ s auf, die kürzeste die Proben der Syndecan-1-Konzentration K1 mit $57,2 \pm 6,0$ s. Für keine der Syndecan-1-Konzentrationen war der Unterschied zur Kontrolle signifikant. Die Clot Formation Time (CFT) war für alle Syndecan-1-Konzentrationen leicht verlängert. Die kürzeste CFT wiesen die Kontrollproben auf mit $96,2 \pm 15,4$ s, die längste die Proben der Konzentration K2 mit $113,9 \pm 23,6$ s. Für K1 und K2 war diese Verlängerung

im Vergleich zur Kontrolle signifikant. Der Alphawinkel war für alle Syndecan-1-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle ($70,7 \pm 3,1^\circ$) leicht abgeflacht. Für die Konzentrationen K1 ($67,5 \pm 3,8^\circ$) und K2 ($67,5 \pm 4,0^\circ$) war dieser Unterschied signifikant. Die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) war für alle Syndecan-1-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ($54,4 \pm 5,1 \text{ mm}$) vermindert. Dieser Unterschied war für alle Syndecan-1-Konzentrationen K1, K2 und K3 signifikant, wobei K1 mit $49,1 \pm 5,4 \text{ mm}$ die niedrigste Gerinnselfestigkeit aufwies. Die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) war im Vergleich zur Kontrolle ($61,4 \pm 4,8 \text{ mm}$) ebenfalls für alle Syndecan-1-Konzentrationen vermindert. Für K1 und K2 war dieser Unterschied signifikant, wobei K1 mit $56,6 \pm 5,5 \text{ mm}$ die geringste MCF aufwies. Die maximale Lyse (ML) zeigte keine signifikanten Änderungen. Die Diagramme in Abbildung 13 auf Seite 51 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

3.4.1.4. EXTEM Hyaluronan

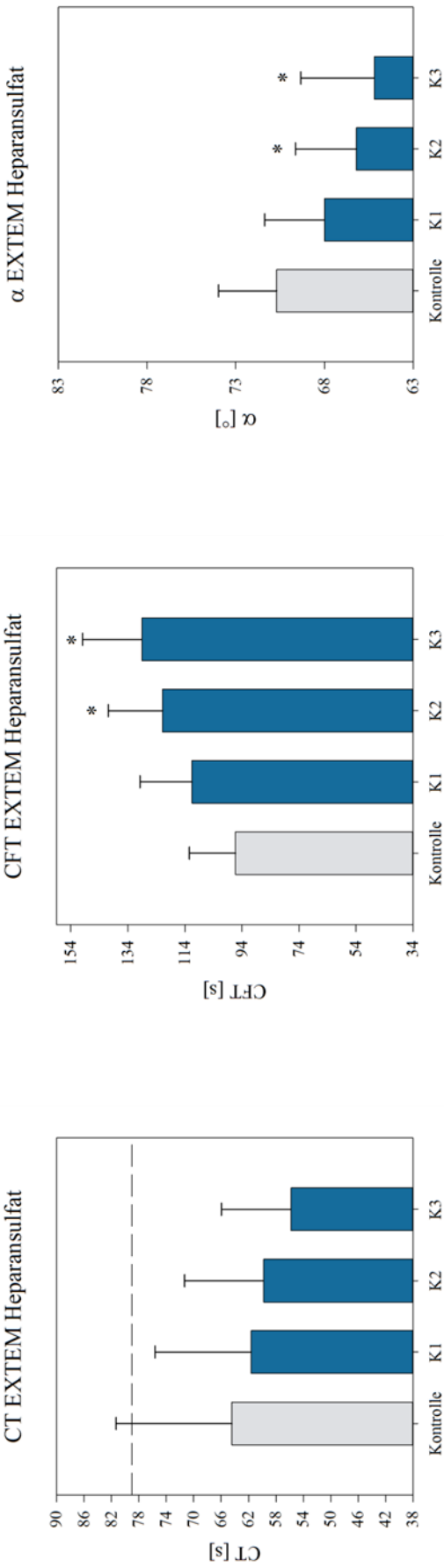
Die Clotting Time (CT) war für die Hyaluronan-Konzentrationen K1, K2 und K3 gegenüber den Kontrollproben leicht verkürzt. Die längste CT wiesen hier die Kontrollproben mit $64,4 \pm 16,0 \text{ s}$ auf, die kürzeste die Proben der Hyaluronan-Konzentration K1 mit $58,4 \pm 7,2 \text{ s}$. Für keine der Hyaluronan-Konzentrationen war der Unterschied zur Kontrolle signifikant. Die Clot Formation Time (CFT) stieg mit wachsenden Hyaluronan-Konzentrationen kontinuierlich an von $96,2 \pm 15,4 \text{ s}$, für die Kontrollproben auf $124,2 \pm 15,5 \text{ s}$ für K3. Für K2 und K3 war diese Verlängerung im Vergleich zur Kontrolle signifikant. Der Alphawinkel flachte mit steigenden Hyaluronan-Konzentrationen ab, von $70,7 \pm 3,1^\circ$ der Kontrolle auf $65,9 \pm 3,2^\circ$ für K3. Signifikant war diese Veränderung für die Konzentrationen K2 und K3 im Vergleich zu den Kontrollproben. Die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) nahm mit steigenden Konzentrationen von Hyaluronan kontinuierlich ab von $54,4 \pm 5,1 \text{ mm}$ der Kontrolle auf $46,6 \pm 4,8 \text{ mm}$ für K3. Auch hier waren die Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle für die Konzentrationen K2 und K3 signifikant. Auch die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) nahm mit steigenden Konzentrationen kontinuierlich ab von $61,4 \pm 4,8 \text{ mm}$ der Kontrolle auf $54,4 \pm 5,4 \text{ mm}$ für K3. Dieser Unterschied zur Kontrolle war für K3 signifikant. Die maximale Lyse (ML) war im Vergleich zur Kontrolle ($8,2 \pm 2,3 \%$) für alle Konzentrationen leicht vermindert. Den niedrigsten Wert wies Hyaluronan K3 mit ($4,9 \pm 3,1 \%$) auf, der Unterschied zur Kontrolle war hierfür signifikant. Die Diagramme in Abbildung 14 auf Seite 52 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

Datentabelle EXTEM

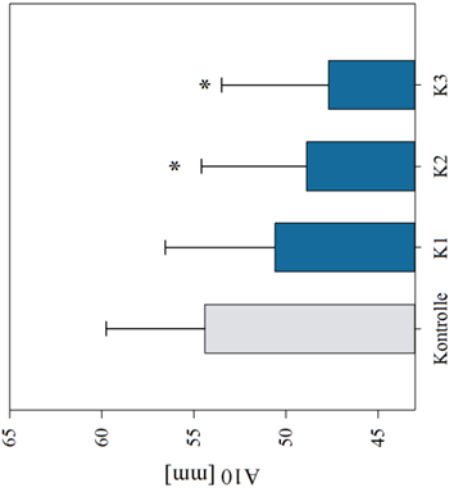
	CT			CFT			A10			MCF			alpha			ML		
	MW	SD	p	MW	SD	p	MW	SD	p	MW	SD	p	MW	SD	p	MW	SD	p
Kontrolle	64,4	16,0		96,2	15,4		54,4	5,1		61,4	4,8		70,7	3,1		8,2	2,3	
HS K1	61,6	13,3	n.s.	111,5	17,3	n.s.	50,6	5,6	n.s.	57,9	5,7	n.s.	68,0	3,2	n.s.	8,5	2,2	n.s.
HS K2	59,8	10,9	n.s.	121,8	18,1	< 0,05	48,9	5,4	< 0,05	56,8	5,6	< 0,05	66,2	3,2	< 0,05	8,2	2,4	n.s.
HS K3	55,8	9,6	n.s.	129,1	19,7	< 0,05	47,7	5,5	< 0,05	55,6	5,5	< 0,05	65,2	3,9	< 0,05	8,3	2,6	n.s.
SY K1	57,2	6,0	n.s.	113,5	21,1	< 0,05	49,1	5,4	< 0,05	56,6	5,5	< 0,05	67,5	3,8	< 0,05	8,0	2,4	n.s.
SY K2	59,0	6,5	n.s.	113,9	23,6	< 0,05	49,7	5,7	< 0,05	57,1	5,8	< 0,05	67,5	4,0	< 0,05	8,2	2,9	n.s.
SY K3	57,4	5,0	n.s.	109,6	21,0	n.s.	50,6	6,1	< 0,05	59,4	7,2	n.s.	68,5	3,8	n.s.	9,3	5,8	n.s.
HA K1	58,4	7,2	n.s.	104,9	20,6	n.s.	52,0	6,6	n.s.	60,0	6,3	n.s.	69,2	3,9	n.s.	6,3	2,5	n.s.
HA K2	63,3	8,9	n.s.	116,6	21,4	< 0,05	49,4	6,0	< 0,05	58,4	5,3	n.s.	67,0	3,9	< 0,05	7,7	4,5	n.s.
HA K3	61,2	7,6	n.s.	124,2	15,5	< 0,05	46,6	4,8	< 0,05	54,4	5,4	< 0,05	65,9	3,2	< 0,05	4,9	3,1	< 0,05

Tabelle 20 zeigt Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), des alpha-Winkels und der maximalen Lyse (ML) im EXTEM. Die Werte wurden für die Kontrollproben , sowie die mit den Konzentrationen K1, K2 und K3 der Testsubstanzen Heparansulfat (HS), Syndecan 1 (SY) und Hyaluronan (HA) inkubierten Proben erfasst. Der p-Wert zeigt signifikante Unterschiede der Testproben zu den Kontrollproben (N = 10; n.s. = nicht signifikant)

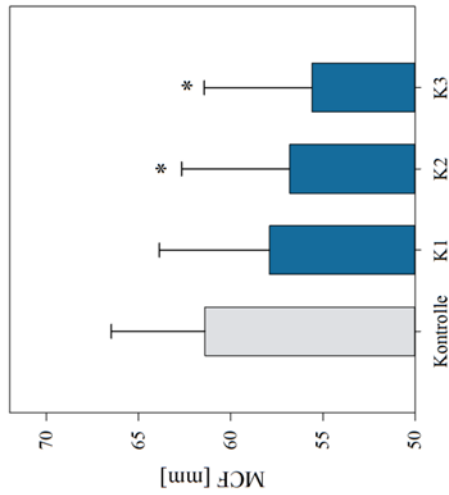
EXTEM Heparansulfat



A10 EXTEM Heparansulfat



MCF EXTEM Heparansulfat



ML EXTEM Heparansulfat

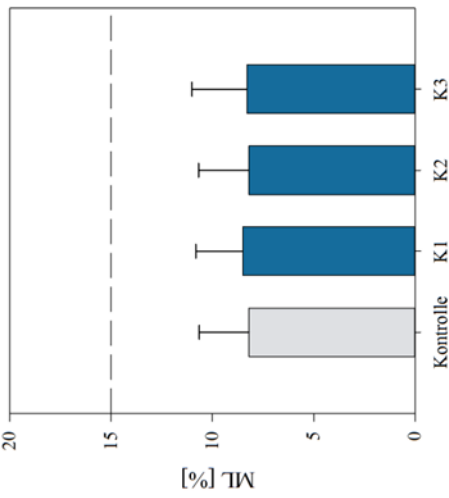


Abbildung 12 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), des alpha-Winkels, der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), sowie der maximalen Lyse (ML) im EXTEM für die mit Heparansulfat inkubierten Testproben. Zum Vergleich sind die Werte der Kontrollproben in grau gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert (N = 10, * p < 0,05 vs. Kontrolle). Die Skalierungen entsprechen den vom Hersteller angegebenen Referenzbereichen, wenn diese zur Darstellung nicht ausreichen, wurden Ober- und/oder Untergrenze als gestrichelte Linien eingezeichnet.

EXTEM Syndecan-1

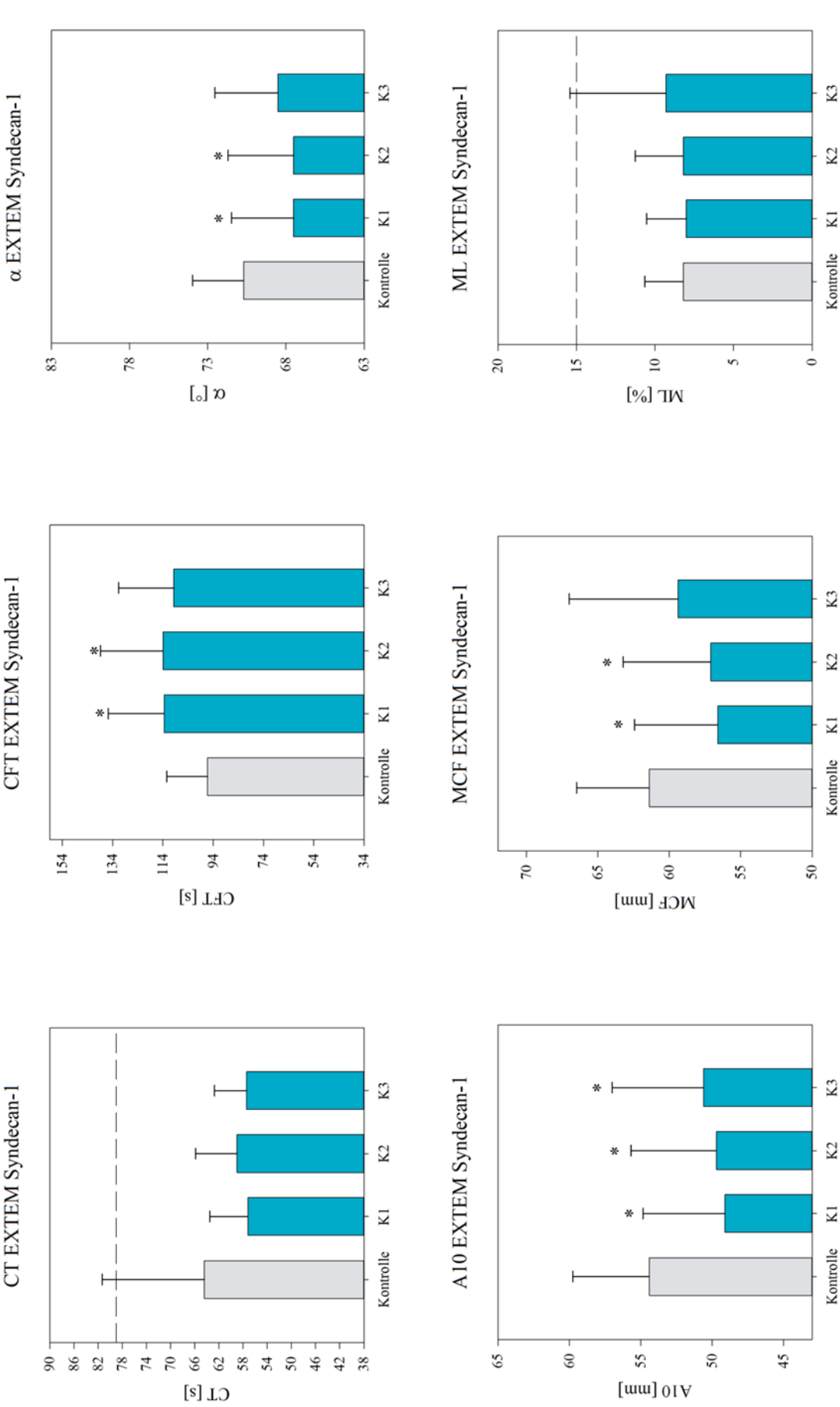


Abbildung 13 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), des alpha-Winkels, der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), sowie der maximalen Lyse (ML) im EXTEM für die mit Syndecan-1 inkubierten Testproben. Zum Vergleich sind die Werte der Kontrollproben in grau gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert (N = 10, * p < 0,05 vs. Kontrolle). Die Skalierungen entsprechen den vom Hersteller angegebenen Referenzbereichen, wenn diese zur Darstellung nicht ausreichen, wurden Ober- und/oder Untergrenze als gestrichelte Linien eingezeichnet.

EXTEM Hyaluronan

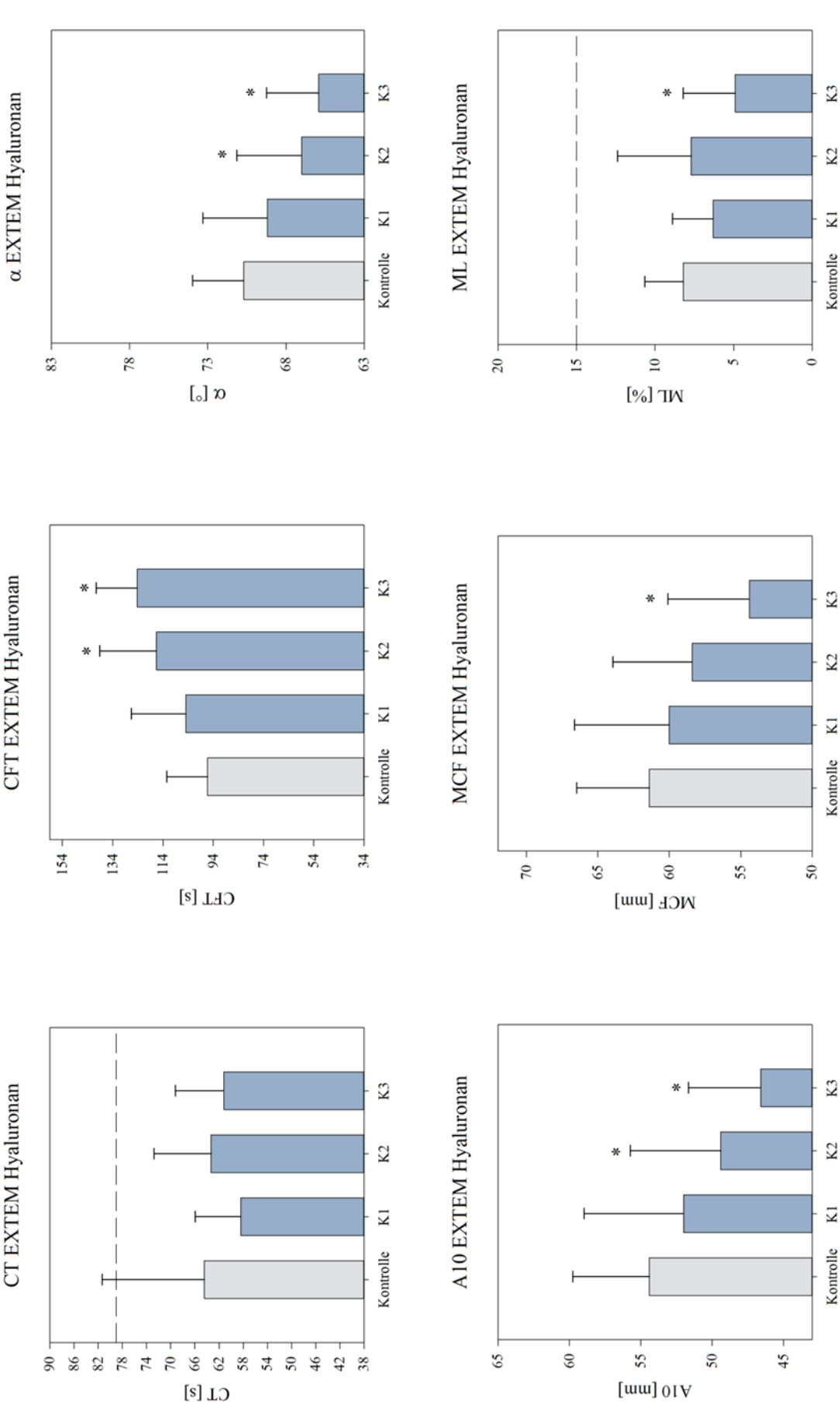


Abbildung 14 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), des alpha-Winkels, der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), sowie der maximalen Lyse (ML) im EXTEM für die mit Hyaluronan inkubierten Testproben. Zum Vergleich sind die Werte der Kontrollproben in grau gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert (N = 10, * p < 0,05 vs. Kontrolle). Die Skalierungen entsprechen den vom Hersteller angegebenen Referenzbereichen, wenn diese zur Darstellung nicht ausreichen, wurden Ober- und/oder Untergrenze als gestrichelte Linien eingezeichnet.

3.4.2. FIBTEM

3.4.2.1. FIBTEM Kontrollproben

Die Kontrollproben der Probanden lagen im Mittelwert für alle gemessenen Parameter im vom Hersteller definierten Referenzbereich (siehe 6.3 Referenzwerte ROTEM®).

3.4.2.2. FIBTEM Heparansulfat

Die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) war für alle Heparansulfat-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ($12,1 \pm 3,6 \text{ mm}$) vermindert. Für K2 ($9,1 \pm 2,7 \text{ mm}$) und K3 ($9,3 \pm 2,5 \text{ mm}$) war der Unterschied zur Kontrolle signifikant, wobei K2 den niedrigsten Wert aufwies. Auch die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) war für alle Heparansulfat-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ($12,4 \pm 3,7 \text{ mm}$) vermindert. Für K2 ($9,6 \pm 2,8 \text{ mm}$) und K3 (idem) war der Unterschied zur Kontrolle signifikant, sie stellten zugleich den niedrigsten Wert dar. Die Diagramme in Abbildung 15 auf Seite 55 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

3.4.2.3. FIBTEM Syndecan-1

Die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) war für alle Syndecan-1-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ($12,1 \pm 3,6 \text{ mm}$) vermindert. Für K1 ($9,3 \pm 2,5 \text{ mm}$) und K2 ($8,9 \pm 2,6 \text{ mm}$) war der Unterschied zur Kontrolle signifikant, wobei K2 den niedrigsten Wert aufwies. Auch die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) war für alle Syndecan-1-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ($12,4 \pm 3,7 \text{ mm}$) vermindert. Für K1 ($9,5 \pm 2,6 \text{ mm}$) und K2 ($9,3 \pm 2,6 \text{ mm}$) war der Unterschied zur Kontrolle signifikant, K2 stellte den niedrigsten Wert dar. Die Diagramme in Abbildung 15 auf Seite 55 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

3.4.2.4. FIBTEM Hyaluronan

Die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) war für alle Hyaluronan-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ($12,1 \pm 3,6 \text{ mm}$) signifikant vermindert. Mit $8,7 \pm 2,6 \text{ mm}$ stellte K2 den niedrigsten Wert dar. Auch die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) war für alle Hyaluronan-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ($12,4 \pm 3,7 \text{ mm}$) signifikant vermindert. Mit $9,0 \pm 2,9 \text{ mm}$ war auch hier der Wert für K2 am niedrigsten. Die Diagramme in Abbildung 15 auf Seite 55 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

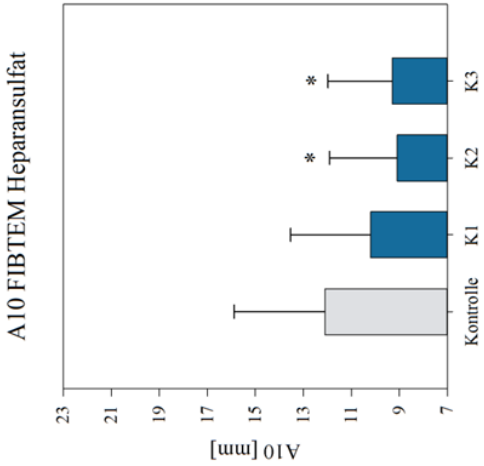
Datentabelle FIBTEM

	A10			MCF		
	MW	SD	p	MW	SD	p
Kontrolle	12,1	3,6		12,4	3,7	
HS K1	10,2	3,2	n.s.	10,5	3,4	n.s.
HS K2	9,1	2,7	< 0,05	9,6	2,8	< 0,05
HS K3	9,3	2,5	< 0,05	9,6	2,8	< 0,05
SY K1	9,3	2,5	< 0,05	9,5	2,6	< 0,05
SY K2	8,9	2,6	< 0,05	9,3	2,6	< 0,05
SY K3	9,8	2,5	n.s.	10,1	2,7	n.s.
HA K1	10,0	3,5	< 0,05	10,4	3,6	< 0,05
HA K2	8,7	2,6	< 0,05	9,0	2,9	< 0,05
HA K3	8,9	2,3	< 0,05	9,4	2,3	< 0,05

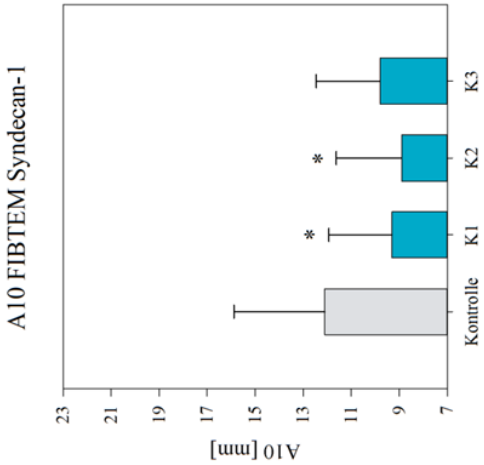
Tabelle 21 zeigt Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der ROTEM-Messparameter Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) im FIBTEM. Die Werte wurden für die Kontrollproben , sowie die mit den Konzentrationen K1, K2 und K3 der Testsubstanzen Heparansulfat (HS), Syndecan 1 (SY) und Hyaluronan (HA) inkubierten Proben erfasst. Der p-Wert zeigt signifikante Unterschiede der Testproben zu den Kontrollproben (N = 10; n.s. = nicht signifikant)

FIBTEM

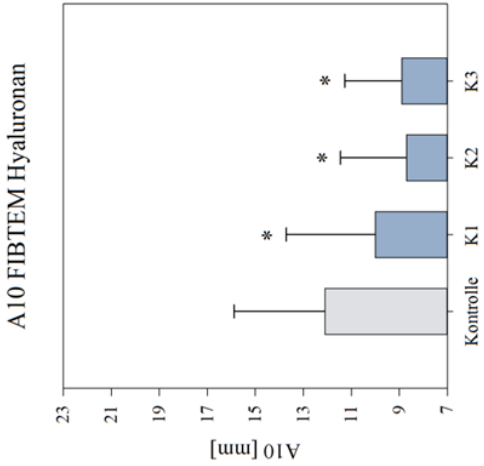
Heparansulfat



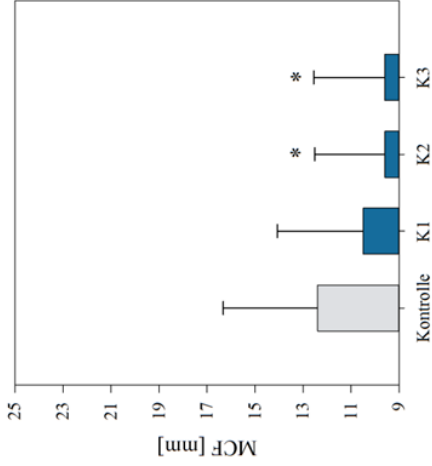
Syndecan-1



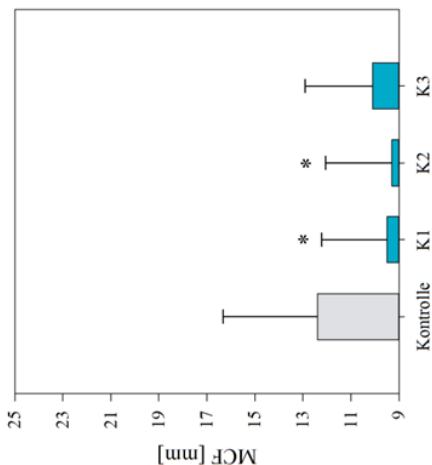
Hyaluronan



MCF FIBTEM Heparansulfat



MCF FIBTEM Syndecan-1



MCF FIBTEM Hyaluronan

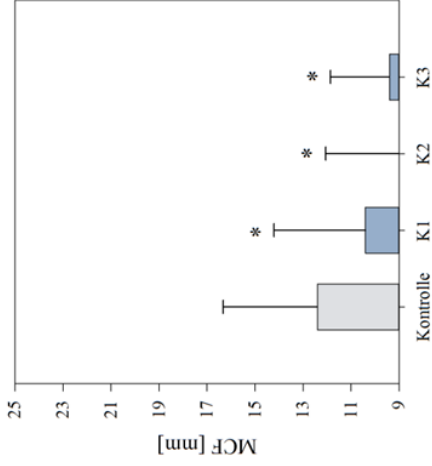


Abbildung 15 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der ROTEM-Messparameter Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) im FIBTEM für die mit Heparansulfat (links), Syndecan-1 (Mitte) und Hyaluronan (rechts) inkubierten Testproben. Zum Vergleich sind die Werte der Kontrollproben in grau gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert (N = 10, * p < 0,05 vs. Kontrolle). Die Skalierungen entsprechen den vom Hersteller angegebenen Referenzbereichen.

3.4.3. INTEM

3.4.3.1. *INTEM Kontrollproben*

Die Kontrollproben der Probanden lagen im Mittelwert für alle gemessenen Parameter im vom Hersteller definierten Referenzbereich (siehe 6.3 Referenzwerte ROTEM®).

3.4.3.2. *INTEM Heparansulfat*

Die Clotting Time (CT) war für die Heparansulfat-Konzentrationen K1 ($229,2 \pm 35,4$ s; $p = 0,004$) und K2 ($227,1 \pm 32,0$ s; $p = 0,006$) erheblich und hoch signifikant gegenüber der Kontrolle ($186,8 \pm 18,0$ s) verlängert. Für K3 ging die CT wieder fast auf den Ausgangswert zurück ($192,2 \pm 14,0$ s). Die Clot Formation Time (CFT) zeigte sich für alle Heparansulfat-Konzentrationen leicht verlängert. Signifikant war dieser Unterschied zur Kontrolle ($74,6 \pm 12,9$ s) jedoch nur für K2 ($86,3 \pm 16,2$ s). Der Alphawinkel zeigte sich für Heparansulfat-Konzentrationen abgeflacht gegenüber der Kontrolle ($75,4 \pm 2,3^\circ$), signifikant war dieser Unterschied auch hier nur für K2 ($72,8 \pm 2,9^\circ$). Die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) war für alle Heparansulfat-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle ($53,4 \pm 4,9$ mm) vermindert. Erneut zeigte sich eine Signifikanz nur für K2 ($50,8 \pm 4,8$ mm). Auch die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) zeigte sich für alle Heparansulfat-Konzentrationen leicht vermindert gegenüber der Kontrolle ($58,4 \pm 5,0$ mm). Signifikant war dieser Unterschied für keine der Konzentrationen. Die maximale Lyse (ML) blieb für alle Konzentrationen nahezu konstant. Die Diagramme in Abbildung 16 auf Seite 59 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

3.4.3.3. *INTEM Syndecan-1*

Die Clotting Time (CT) unterschied sich für keine der Syndecan-1-Konzentrationen signifikant von der Kontrolle ($186,8 \pm 18,0$ s). Der größte Unterschied zur Kontrolle ergab sich für K3 ($205,4 \pm 32,7$ s). Die Clot Formation Time (CFT) zeigte sich für alle Syndecan-1-Konzentrationen leicht verlängert. Signifikant war dieser Unterschied zur Kontrolle ($74,6 \pm 12,9$ s) für K2 ($94,0 \pm 18,2$ s) und K3 ($93,0 \pm 22,4$ s). Der Alphawinkel zeigte sich für alle Syndecan-1-Konzentrationen leicht abgeflacht gegenüber der Kontrolle ($75,4 \pm 2,3^\circ$). signifikant war dieser Unterschied auch hier für K2 ($72,0 \pm 2,7^\circ$) und K3 ($72,1 \pm 4,3^\circ$). Die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) war für alle Syndecan-1-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle ($53,4 \pm 4,9$ mm) signifikant vermindert. Die größte Differenz zur Kontrolle zeigte sich für K2 ($49,3 \pm 5,0$ mm). Auch die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) zeigte sich für alle Syndecan-1-Konzentrationen leicht vermindert gegenüber der Kontrolle ($58,4 \pm 5,0$ mm). Signifikant war dieser Unterschied für K1 und K2. Den größten

Unterschied zur Kontrolle zeigte K2 mit $54,8 \pm 4,9 \text{ mm}$. Die maximale Lyse (ML) blieb für alle Konzentrationen nahezu konstant. Die Diagramme in Abbildung 17 auf Seite 60 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

3.4.3.4. *INTEM Hyaluronan*

Die Clotting Time (CT) unterschied sich für keine der Hyaluronan-Konzentrationen signifikant von der Kontrolle ($186,8 \pm 18,0 \text{ s}$). Der größte Unterschied zur Kontrolle ergab sich für K1 ($210,9 \pm 30,0 \text{ s}$). Die Clot Formation Time (CFT) stieg mit den Hyaluronan-Konzentrationen kontinuierlich an. Im Vergleich zur Kontrolle ($74,6 \pm 12,9 \text{ s}$) waren K2 ($97,1 \pm 19,9 \text{ s}$) und K3 ($109,4 \pm 30,5 \text{ s}$) signifikant erhöht, K3 zeigte die größte Differenz zur Kontrolle. Der Alphawinkel flachte mit steigenden Hyaluronan-Konzentrationen kontinuierlich ab. Gegenüber der Kontrolle ($75,4 \pm 2,3^\circ$) waren K2 ($71,4 \pm 3,5^\circ$) und K3 ($70,0 \pm 4,9^\circ$) signifikant vermindert, K3 zeigte hierbei den größten Unterschied. Die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) sank mit steigenden Hyaluronan-Konzentrationen kontinuierlich. Gegenüber der Kontrolle ($53,4 \pm 4,9 \text{ mm}$) waren K2 ($49,0 \pm 5,6 \text{ mm}$) und K3 ($45,0 \pm 6,1 \text{ mm}$) signifikant vermindert, K3 zeigte den größten Unterschied zur Kontrolle. Die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) zeigte sich für die Hyaluronan-Konzentrationen K2 und K3 vermindert gegenüber der Kontrolle ($58,4 \pm 5,0 \text{ mm}$). Signifikant war dieser Unterschied für K3. Mit $51,9 \pm 6,8 \text{ mm}$ zeigte K3 zugleich den größten Unterschied zur Kontrolle. Die maximale Lyse (ML) schwankte um den Kontrollwert ($9,5 \pm 2,6 \%$). Ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ergab sich für K3 ($5,6 \pm 2,7 \%$). Die Diagramme in Abbildung 18 auf Seite 61 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

Datentabelle INTEM

	CT			CFT			A10			MCF			alpha			ML		
	MW	SD	p	MW	SD	p	MW	SD	p	MW	SD	p	MW	SD	p	MW	SD	p
Kontrolle	186,8	18,0		74,6	12,9		53,4	4,9		58,4	5,0		75,4	2,3		9,5	2,6	
HS K1	229,2	35,4	0,004	87,2	14,1	n.s.	51,2	4,1	n.s.	56,1	4,4	n.s.	72,7	2,5	n.s.	10,0	2,6	n.s.
HS K2	227,1	32,0	0,006	86,3	16,2	< 0,05	50,8	4,8	< 0,05	56,1	5,1	n.s.	72,8	2,9	< 0,05	8,8	2,6	n.s.
HS K3	192,2	14,0	n.s.	83,3	12,9	n.s.	50,8	4,2	n.s.	56,4	4,2	n.s.	73,7	2,6	n.s.	9,2	3,2	n.s.
SY K1	173,6	23,3	n.s.	87,7	19,5	n.s.	50,4	5,2	< 0,05	55,7	5,1	< 0,05	72,8	3,8	n.s.	9,8	3,0	n.s.
SY K2	187,3	20,7	n.s.	94,0	18,2	< 0,05	49,3	5,0	< 0,05	54,8	4,9	< 0,05	72,0	2,7	< 0,05	9,2	3,0	n.s.
SY K3	205,4	32,7	n.s.	93,0	22,4	< 0,05	50,2	5,8	< 0,05	56,8	6,2	n.s.	72,1	4,3	< 0,05	9,2	3,2	n.s.
HA K1	210,9	30,0	n.s.	83,7	17,2	n.s.	52,0	5,3	n.s.	58,4	5,5	n.s.	73,4	3,3	n.s.	7,2	3,2	n.s.
HA K2	196,5	25,9	n.s.	97,1	19,9	< 0,05	49,0	5,6	< 0,05	56,6	5,2	n.s.	71,4	3,5	< 0,05	10,3	5,2	n.s.
HA K3	182,7	22,7	n.s.	109,4	30,5	< 0,05	45,0	6,1	< 0,05	51,9	6,8	< 0,05	70,0	4,9	< 0,05	5,6	2,7	< 0,05

Tabelle 22 zeigt Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), des alpha-Winkels und der maximalen Lyse (ML) im INTEM. Die Werte wurden für die Kontrollproben , sowie die mit den Konzentrationen K1, K2 und K3 der Testsubstanzen Heparansulfat (HS), Syndecan 1 (SY) und Hyaluronan (HA) inkubierten Proben erfasst. Der p-Wert zeigt signifikante Unterschiede der Testproben zu den Kontrollproben (N = 10; n.s. = nicht signifikant)

INTEM Heparansulfat

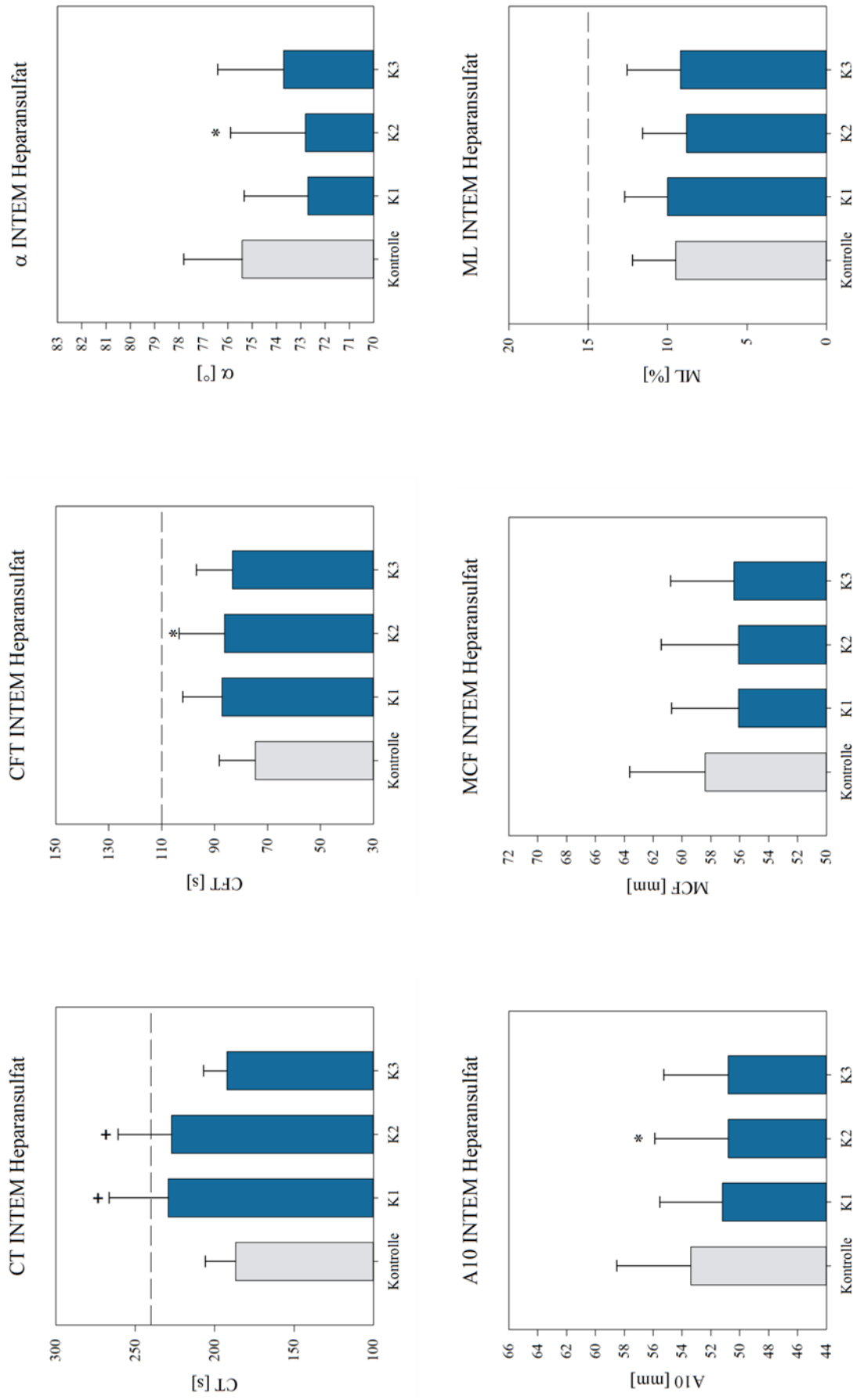


Abbildung 16 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), des alpha-Winkels, der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), sowie der maximalen Lyse (ML) im INTEM für die mit Heparansulfat inkubierten Testproben. Zum Vergleich sind die Werte der Kontrollproben in grau gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert (p < 0,05 vs. Kontrolle), hoch signifikante mit + (p < 0,01 vs. Kontrolle); N = 10. Die Skalierungen entsprechen den vom Hersteller angegebenen Referenzbereichen, wenn diese zur Darstellung nicht ausreichten, wurden Ober- und/oder Untergrenze als gestrichelte Linien eingezeichnet.

INTEM Syndecan-1

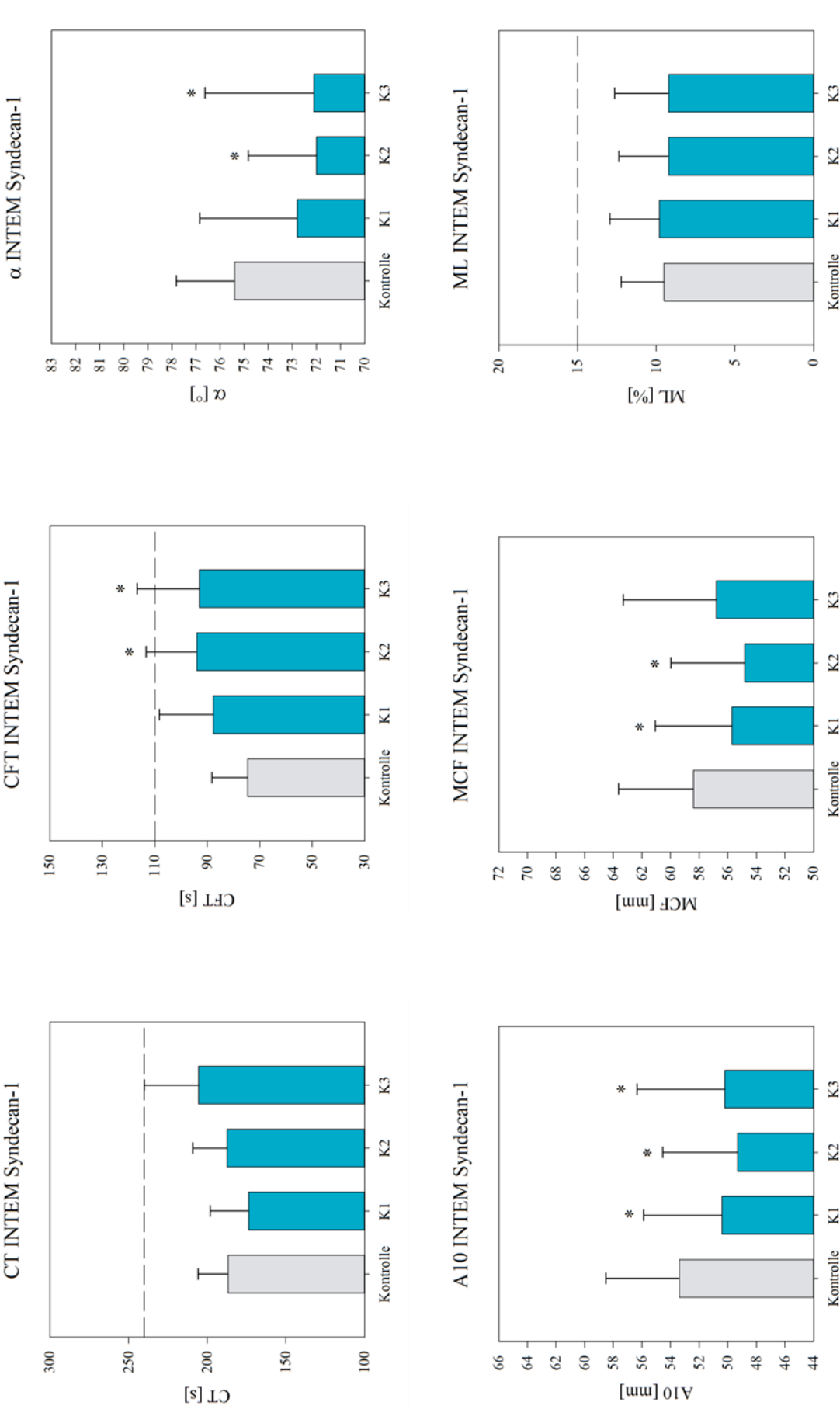


Abbildung 17 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), des alpha-Winkels, der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), sowie der maximalen Lyse (ML) im INTEM für die mit Syndecan 1 inkubierten Testproben. Zum Vergleich sind die Werte der Kontrollproben in grau gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert (N = 10, * p < 0,05 vs. Kontrolle). Die Skalierungen entsprechen den vom Hersteller angegebenen Referenzbereichen, wenn diese zur Darstellung nicht ausreichen, wurden Ober- und/oder Untergrenze als gestrichelte Linien eingezeichnet.

INTEM Hyaluronan

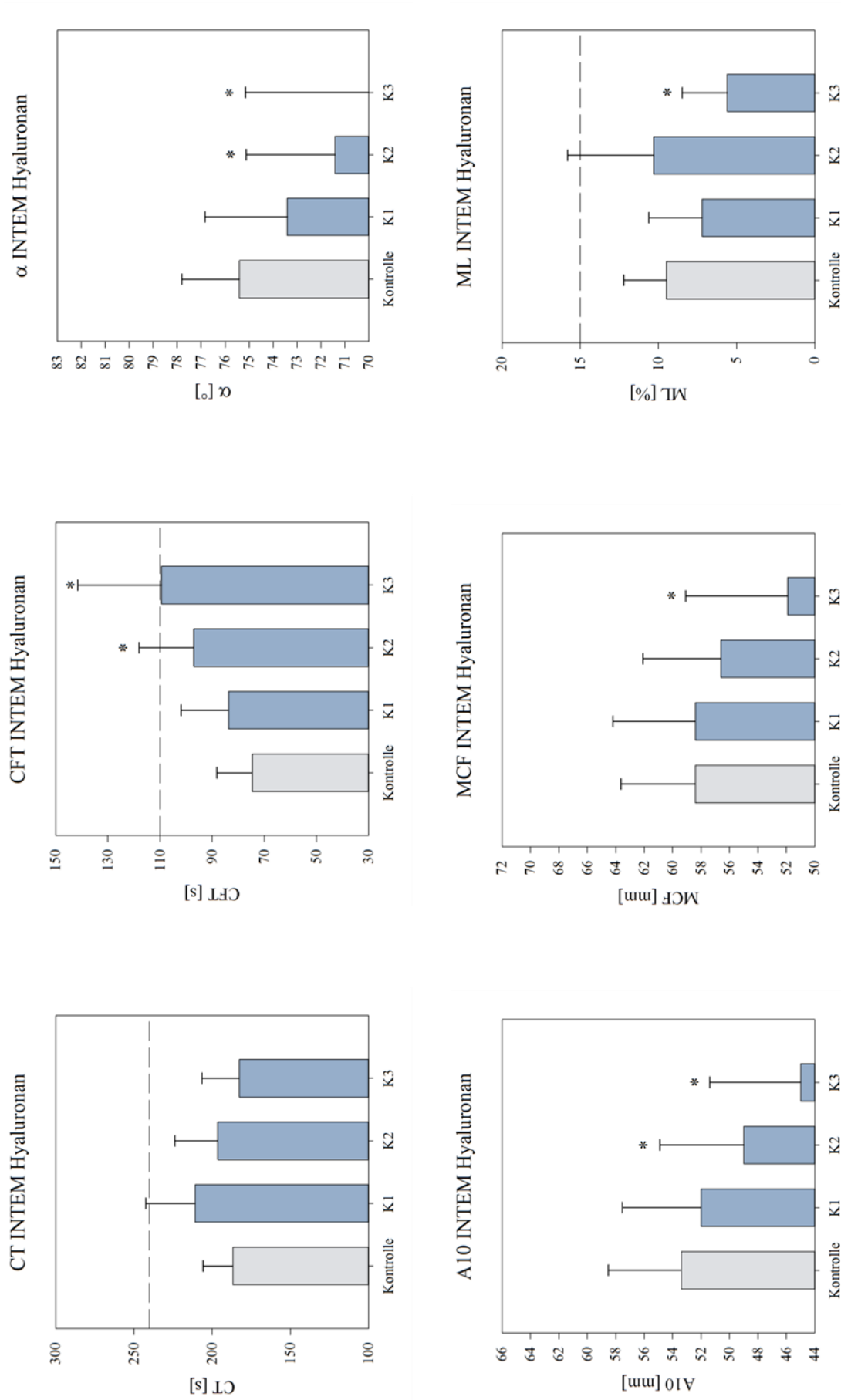


Abbildung 18 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), des alpha-Winkels, der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), sowie der maximalen Lyse (ML) im INTEM für die mit Hyaluronan inkubierten Testproben. Zum Vergleich sind die Werte der Kontrollproben in grau gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert (N = 10, * p < 0,05 vs. Kontrolle). Die Skalierungen entsprechen den vom Hersteller angegebenen Referenzbereichen, wenn diese zur Darstellung nicht ausreichen, wurden Ober- und/oder Untergrenze als gestrichelte Linien eingezeichnet.

3.4.4. HEPTM

3.4.4.1. HEPTM Kontrollproben

Für die HEPTM-Messungen gibt der Hersteller keine eigenen Referenzwerte an, sondern verweist auf den Vergleich zu INTEM-Messungen (siehe 6.3 Referenzwerte ROTEM®). Daher wurden zur Auswertung der HEPTM-Messungen die Referenzwerte der INTEM-Messungen herangezogen. Sämtliche Messwerte der Kontrollproben lagen hierbei innerhalb des Referenzbereichs für INTEM. Die Clotting Time (CT) der Kontrollproben mit $206,9 \pm 36,5$ s im HEPTM war allerdings um gut 20 s gegenüber der Clotting Time der Kontrollproben im INTEM verlängert ($186,8 \pm 18,0$ s). Für den Vergleich zwischen INTEM und HEPTM wurden daher die Differenzen der Kontrollwerte gleich null gesetzt (siehe Kapitel 3.4.6.1).

3.4.4.2. HEPTM Heparansulfat

Die Clotting Time (CT) war für die Heparansulfat-Konzentration K1 ($217,5 \pm 24,7$ s) erhöht, für K2 ($198,0 \pm 34,8$ s) und K3 ($172,2 \pm 19,4$ s) vermindert. Für keine der Konzentrationen war der Unterschied zur Kontrolle ($206,9 \pm 36,5$ s) signifikant. Die Clot Formation Time (CFT) stieg mit steigenden Heparansulfat-Konzentrationen leicht an von $79,3 \pm 14,9$ s (Kontrolle) auf $91,6 \pm 24,7$ s (K3). Der Unterschied zur Kontrolle war für keine der Konzentrationen signifikant. Der Alphawinkel zeigte sich für alle Heparansulfat-Konzentrationen abgeflacht gegenüber der Kontrolle ($74,4 \pm 2,9^\circ$), den größten Unterschied zur Kontrolle zeigte K2 ($72,4 \pm 3,5^\circ$). Signifikant war dieser nicht. Die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) war für alle Heparansulfat-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle ($51,8 \pm 3,8$ mm) vermindert. Am geringsten war sie für K3 ($48,3 \pm 4,9$ mm), jedoch war keiner der Unterschied zur Kontrolle signifikant. Auch die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) zeigte sich für alle Heparansulfat-Konzentrationen signifikant vermindert gegenüber der Kontrolle ($57,1 \pm 3,8$ mm). Am niedrigsten war die MCF für K1 ($53,3 \pm 6,0$ mm). Die maximale Lyse (ML) blieb für alle Konzentrationen nahezu konstant. Die Diagramme in Abbildung 19 auf Seite 65 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

3.4.4.3. HEPTM Syndecan-1

Die Clotting Time (CT) unterschied sich für keine der Syndecan-1-Konzentrationen signifikant von der Kontrolle ($206,9 \pm 36,5$ s), schwankte jedoch erheblich von $187,5 \pm 25,7$ s (K1) bis $222,5 \pm 45,7$ s (K3). Die Clot Formation Time (CFT) war für alle Syndecan-1-Konzentrationen signifikant zur Kontrolle ($79,3 \pm 14,9$ s) verlängert. Der höchste Wert ergab sich für K3 ($97,0 \pm 20,1$ s). Der Alphawinkel zeigte sich für alle Syndecan-1-

Konzentrationen signifikant abgeflacht gegenüber der Kontrolle ($74,4 \pm 2,9^\circ$). Der niedrigste Wert ergab sich hier für K2 ($71,4 \pm 2,8^\circ$). Die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) war für alle Syndecan-1-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle ($51,8 \pm 3,8 \text{ mm}$) signifikant vermindert. Die größte Differenz zur Kontrolle zeigte sich für K2 ($48,0 \pm 4,9 \text{ mm}$). Auch die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) zeigte sich für alle Syndecan-1-Konzentrationen vermindert gegenüber der Kontrolle ($57,1 \pm 3,8 \text{ mm}$). Signifikant war dieser Unterschied für K2 und K3. Den größten Unterschied zur Kontrolle zeigte K2 mit $53,4 \pm 5,6 \text{ mm}$. Die maximale Lyse (ML) blieb für alle Konzentrationen nahezu konstant. Die Diagramme in Abbildung 20 auf Seite 66 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

3.4.4.4. HEPTEM Hyaluronan

Die Clotting Time (CT) unterschied sich für keine der Hyaluronan-Konzentrationen signifikant von der Kontrolle ($206,9 \pm 36,5 \text{ s}$), schwankte jedoch erheblich von $215,3 \pm 38,9 \text{ s}$ (K1) bis $173,3 \pm 22,5 \text{ s}$ (K3). Die Clot Formation Time (CFT) stieg mit wachsenden Hyaluronan-Konzentrationen kontinuierlich von $79,3 \pm 14,9 \text{ s}$ (Kontrolle) auf $118,6 \pm 26,7 \text{ s}$ (K3) an. Der Unterschied zur Kontrolle war für alle Konzentrationen signifikant. Der Alphawinkel zeigte sich für alle Hyaluronan-Konzentrationen signifikant abgeflacht gegenüber der Kontrolle ($74,4 \pm 2,9^\circ$). Der niedrigste Wert ergab sich hier für K3 ($68,4 \pm 4,8^\circ$). Die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) sank mit steigenden Hyaluronan-Konzentrationen kontinuierlich von $51,8 \pm 3,8 \text{ mm}$ (Kontrolle) auf $43,3 \pm 5,6 \text{ mm}$ (K3). Der Unterschied zur Kontrolle war für alle Konzentrationen signifikant. Auch die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) sank mit steigenden Hyaluronan-Konzentrationen kontinuierlich von $57,1 \pm 3,8 \text{ mm}$ (Kontrolle) auf $46,5 \pm 15,0 \text{ mm}$ (K3). Signifikant war dieser Unterschied nur für K3. Die maximale Lyse (ML) blieb für alle Konzentrationen nahezu konstant. Die Diagramme in Abbildung 21 auf Seite 67 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

Datentabelle HEPTTEM

	CT			CFT			A10			MCF			alpha			ML		
	MW	SD	p	MW	SD	p	MW	SD	p	MW	SD	p	MW	SD	p	MW	SD	p
Kontrolle	206,9	36,5		79,3	14,9		51,8	3,8		57,1	3,8		74,4	2,9		9,8	2,3	
HS K1	217,5	24,7	n.s.	89,5	14,8	n.s.	48,6	5,2	n.s.	53,3	6,0	< 0,05	72,6	3,0	n.s.	11,4	4,0	n.s.
HS K2	198,0	34,8	n.s.	90,1	19,7	n.s.	48,7	5,3	n.s.	53,6	5,4	< 0,05	72,4	3,5	n.s.	9,6	2,3	n.s.
HS K3	172,2	19,4	n.s.	91,6	24,7	n.s.	48,3	4,9	n.s.	53,4	5,0	< 0,05	72,5	4,5	n.s.	10,2	3,1	n.s.
SY K1	187,5	25,7	n.s.	93,9	21,7	< 0,05	48,7	5,4	< 0,05	53,5	5,7	n.s.	72,0	3,7	< 0,05	10,7	2,9	n.s.
SY K2	197,9	31,1	n.s.	95,9	16,9	< 0,05	48,0	4,9	< 0,05	53,4	5,6	< 0,05	71,4	2,8	< 0,05	10,1	3,1	n.s.
SY K3	222,5	45,7	n.s.	97,0	20,1	< 0,05	48,1	5,9	< 0,05	53,9	6,6	< 0,05	71,5	3,2	< 0,05	9,7	3,7	n.s.
HA K1	215,3	38,9	n.s.	95,3	22,4	< 0,05	48,3	6,0	< 0,05	54,6	6,5	n.s.	71,8	4,1	< 0,05	7,8	2,6	n.s.
HA K2	183,5	22,6	n.s.	99,0	18,4	< 0,05	46,3	3,8	< 0,05	52,3	4,0	n.s.	71,7	3,1	< 0,05	12,3	7,8	n.s.
HA K3	173,3	22,5	n.s.	118,6	26,7	< 0,05	43,3	5,6	< 0,05	46,5	15,0	< 0,05	68,4	4,8	< 0,05	10,2	17,4	n.s.

Tabelle 23 zeigt Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), des alpha-Winkels und der maximalen Lyse (ML) im HEPTTEM. Die Werte wurden für die Kontrollproben, sowie die mit den Konzentrationen K1, K2 und K3 der Testsubstanzen Heparansulfat (HS), Syndecan 1 (SY) und Hyaluronan (HA) inkubierten Proben erfasst. Der p-Wert zeigt signifikante Unterschiede der Testproben zu den Kontrollproben (N = 10; n.s. = nicht signifikant)

HEPTEM Heparansulfat

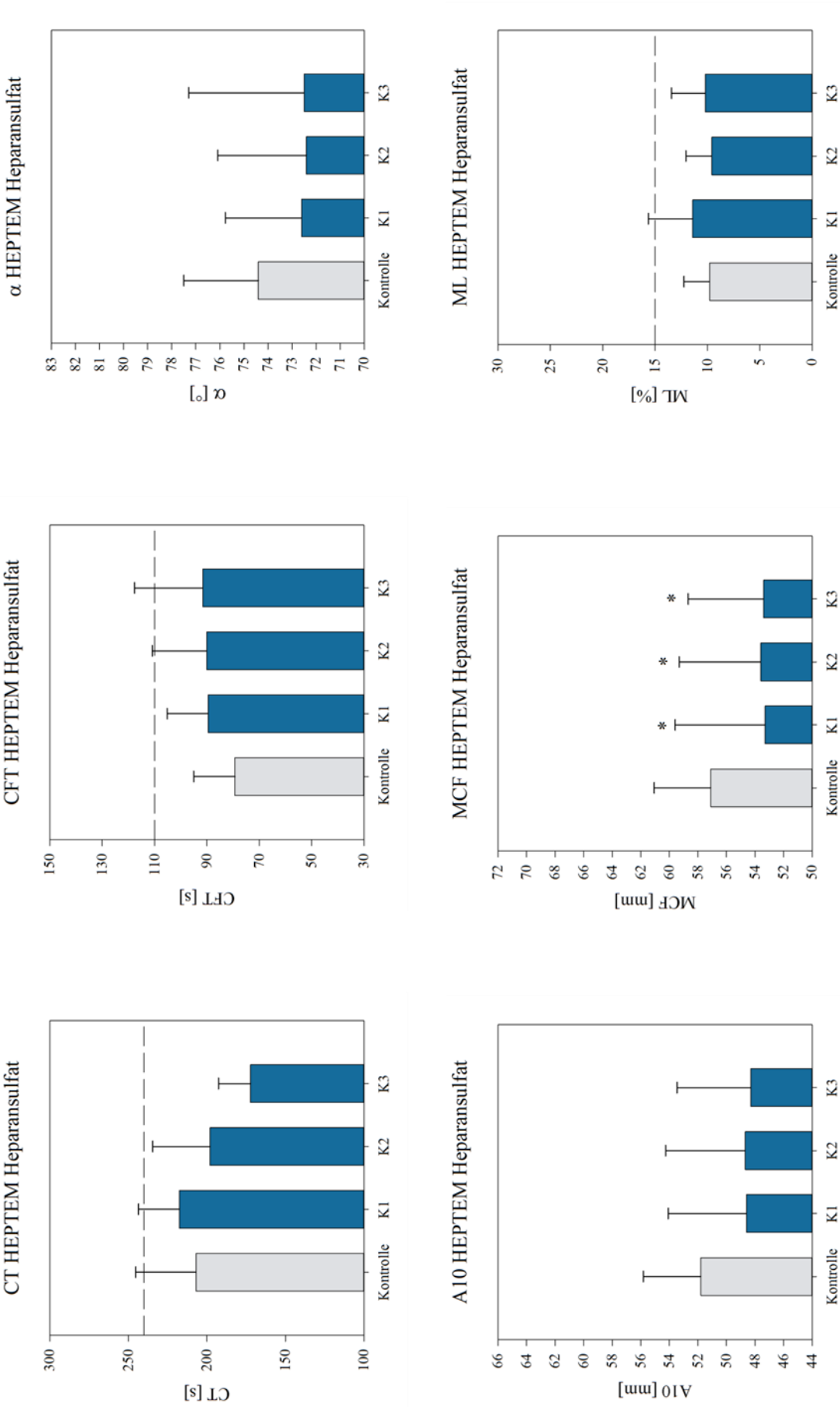


Abbildung 19 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), des alpha-Winkels, der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), sowie der maximalen Lyse (ML) im HEPTEM für die mit Heparansulfat inkubierten Testproben. Zum Vergleich sind die Werte der Kontrollproben in grau gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert (N = 10, * p < 0,05 vs. Kontrolle). Die Skalierungen entsprechen den vom Hersteller angegebenen Referenzbereichen, wenn diese zur Darstellung nicht ausreichen, wurden Ober- und/oder Untergrenze als gestrichelte Linien eingezeichnet.

HEPTEM Syndecan-1

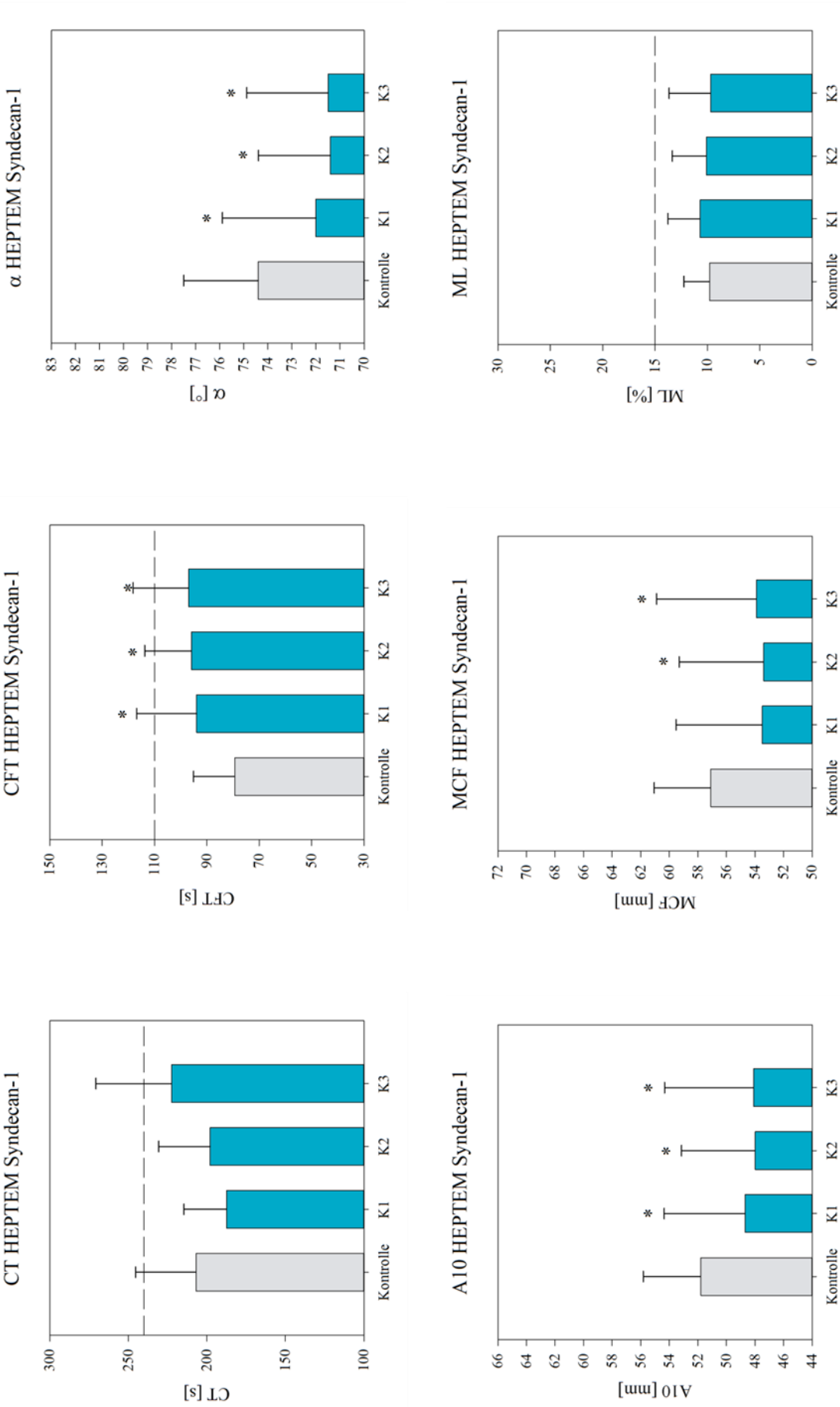


Abbildung 20 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), des alpha-Winkels, der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), sowie der maximalen Lyse (ML) im HEPTEM für die mit Syndecan-1 inkubierten Testproben. Zum Vergleich sind die Werte der Kontrollproben in grau gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert ($N = 10$, $* p < 0,05$ vs. Kontrolle). Die Skalierungen entsprechen den vom Hersteller angegebenen Referenzbereichen, wenn diese zur Darstellung nicht ausreichen, wurden Ober- und/oder Untergrenze als gestrichelte Linien eingezeichnet.

HEPTEM Hyaluronan

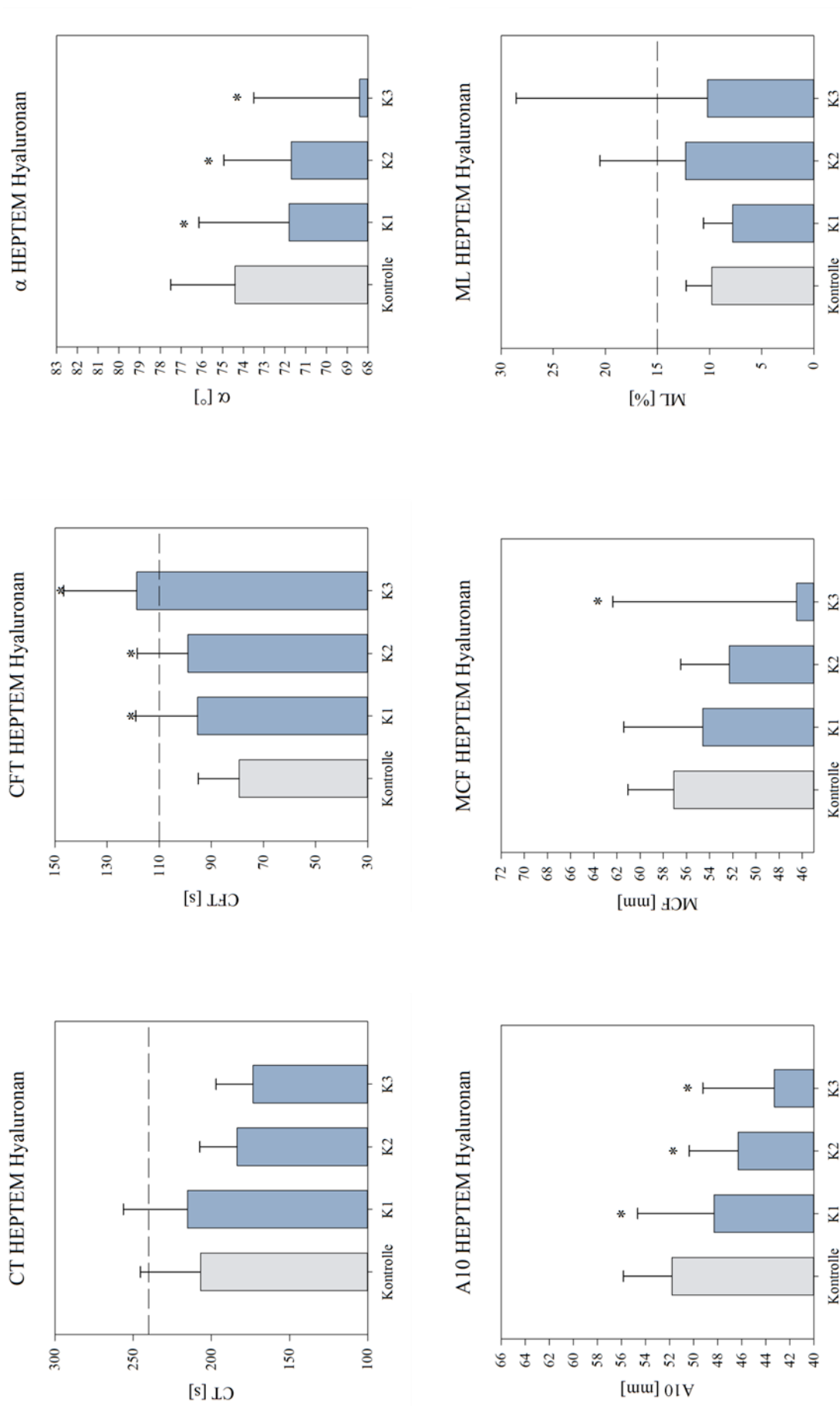


Abbildung 21 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), des alpha-Winkels, der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), sowie der maximalen Lyse (ML) im HEPTEM für die mit Hyaluronan inkubierten Testproben. Zum Vergleich sind die Werte der Kontrollproben in grau gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert ($N = 10$, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Die Skalierungen entsprechen den vom Hersteller angegebenen Referenzbereichen, wenn diese zur Darstellung nicht ausreichen, wurden Ober- und/oder Untergrenze als gestrichelte Linien eingezeichnet.

3.4.5. Vergleich FIBTEM/EXTEM

Um den Anteil der Thrombozyten an der Gerinnselbildung zu beurteilen, wurden die Ergebnisse der EXTEM- und FIBTEM-Tests verglichen. Hierzu wurde für die einzelnen Probanden jeweils der Quotient der A10- und MCF-Werte aus der EXTEM- und FIBTEM-Messungen gebildet und anschließend eine statistische Analyse durchgeführt (siehe Tabelle 24 auf Seite 70).

3.4.5.1. FIBTEM/EXTEM Kontrollproben

Die Mittelwerte sämtlicher Kontrollproben lagen sowohl im EXTEM (A10: $54,4 \pm 5,1 \text{ mm}$; MCF: $61,4 \pm 4,8 \text{ mm}$) als auch im FIBTEM (A10: $12,1 \pm 3,6 \text{ mm}$; MCF: $12,4 \pm 3,7 \text{ mm}$) im vom Hersteller angegebenen Referenzbereich. Somit können auch die Quotienten

$$\text{Quotient A10} = \frac{A10_{\text{FIBTEM}}}{A10_{\text{EXTEM}}} = 22,2 \pm 6,8 \%$$

$$\text{Quotient MCF} = \frac{MCF_{\text{FIBTEM}}}{MCF_{\text{EXTEM}}} = 20,1 \pm 6,2 \%$$
 als normwertig betrachtet werden.

3.4.5.2. FIBTEM/EXTEM Heparansulfat

Der Quotient der Gerinnselhaftigkeit nach 10 Minuten (Quotient A10) war für alle Heparansulfat-Konzentrationen leicht gegenüber der Kontrolle ($22,2 \pm 6,8 \%$) vermindert, der niedrigste Wert ergab sich für Heparansulfat K2 ($18,3 \pm 3,8 \%$). Signifikant war diese Veränderung für keine der Heparansulfat-Konzentrationen. Auch der Quotient der maximalen Gerinnselhaftigkeit (Quotient MCF) war für alle Heparansulfat-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ($20,1 \pm 6,2 \%$) vermindert. Der niedrigste Wert ergab sich auch hier für Heparansulfat K2 ($16,7 \pm 3,4 \%$). Auch hier war diese Veränderung für keine der Heparansulfat-Konzentrationen signifikant. Die Diagramme in Abbildung 22 auf Seite 71 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

3.4.5.3. FIBTEM/EXTEM Syndecan-1

Der Quotient der Gerinnselhaftigkeit nach 10 Minuten (Quotient A10) war für alle Syndecan-1-Konzentrationen leicht gegenüber der Kontrolle ($22,2 \pm 6,8 \%$) vermindert, der niedrigste Wert ergab sich für Syndecan-1 K2 ($17,6 \pm 3,4 \%$). Für K2 war diese Veränderung signifikant. Auch der Quotient der maximalen Gerinnselhaftigkeit (Quotient MCF) war für alle Syndecan-1-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ($20,1 \pm 6,2 \%$) vermindert. Der niedrigste Wert ergab sich auch hier für Syndecan-1 K2 ($16,1 \pm 3,4 \%$). Auch hier war diese Veränderung für K2 signifikant. Die Diagramme in Abbildung 22 auf Seite 71 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

3.4.5.4. FIBTEM/EXTEM Hyaluronan

Der Quotient der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (Quotient *A10*) war für alle Hyaluronan-Konzentrationen leicht gegenüber der Kontrolle ($22,2 \pm 6,8 \%$) vermindert, der niedrigste Wert ergab sich für Hyaluronan K2 ($17,3 \pm 3,4 \%$). Für K2 war diese Veränderung signifikant. Auch der Quotient der maximalen Gerinnselfestigkeit (Quotient *MCF*) war für alle Hyaluronan-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ($20,1 \pm 6,2 \%$) vermindert. Der niedrigste Wert ergab sich auch hier für Hyaluronan K2 ($15,2 \pm 3,6 \%$). Die Veränderungen waren für K2 und K1 ($17,1 \pm 5,1 \%$) signifikant. Die Diagramme in Abbildung 22 auf Seite 71 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

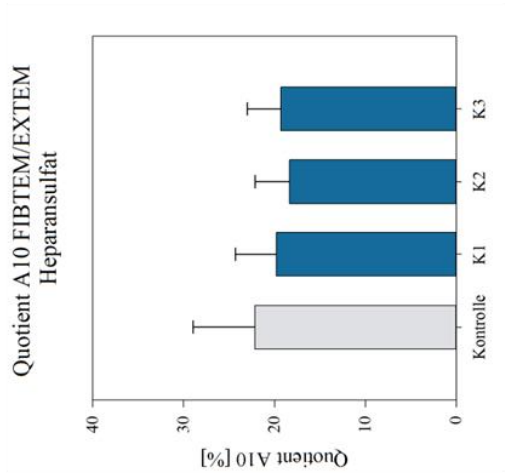
Datentabelle Quotient FIBTEM/EXTEM

	Quotient A10 = A10 _{FIBTEM} / A10 _{EXTEM}			Quotient MCF = MCF _{FIBTEM} / MCF _{EXTEM}		
	MW	SD	p	MW	SD	p
Kontrolle	22,2%	6,8%		20,1%	6,2%	
HS K1	19,8%	4,5%	n.s.	17,8%	4,5%	n.s.
HS K2	18,3%	3,8%	n.s.	16,7%	3,4%	n.s.
HS K3	19,3%	3,7%	n.s.	17,1%	3,7%	n.s.
SY K1	18,7%	3,4%	n.s.	16,6%	3,2%	n.s.
SY K2	17,6%	3,4%	< 0,05	16,1%	3,4%	< 0,05
SY K3	19,1%	3,3%	n.s.	16,9%	3,3%	n.s.
HA K1	18,9%	5,3%	n.s.	17,1%	5,1%	< 0,05
HA K2	17,3%	3,4%	< 0,05	15,2%	3,6%	< 0,05
HA K3	18,9%	3,5%	n.s.	17,1%	3,1%	n.s.

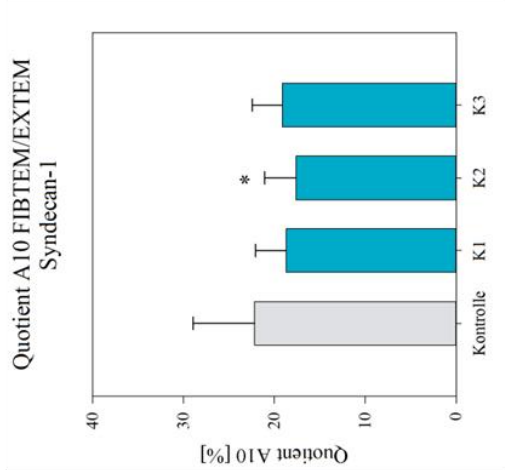
Tabelle 24 zeigt Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der ROTEM-Messparameter Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) als Quotienten der Messungen im EXTEM und FIBTEM in [%]. Die Werte wurden für die Kontrollproben , sowie die mit den Konzentrationen K1, K2 und K3 der Testsubstanzen Heparansulfat (HS), Syndecan 1 (SY) und Hyaluronan (HA) inkubierten Proben erfasst. Der p-Wert zeigt signifikante Unterschiede der Testproben zu den Kontrollproben (N = 10; n.s. = nicht signifikant)

Vergleich FIBTEM vs. EXTEM

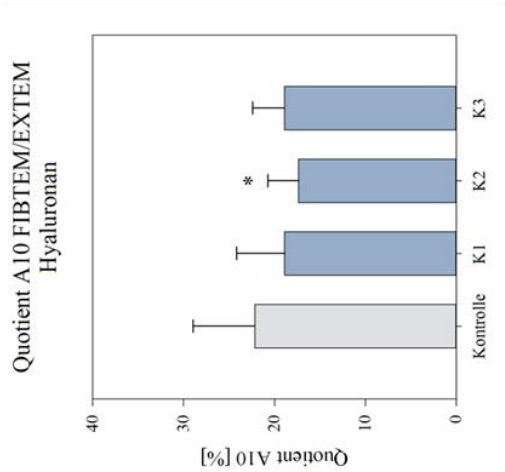
Heparansulfat



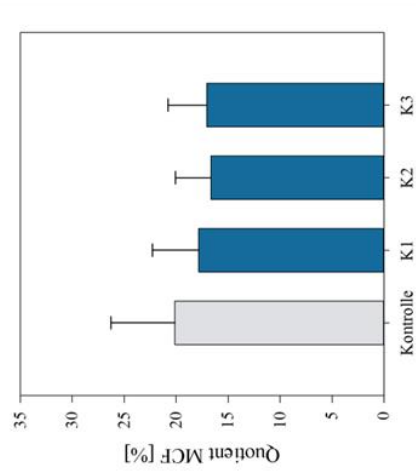
Syndecan-1



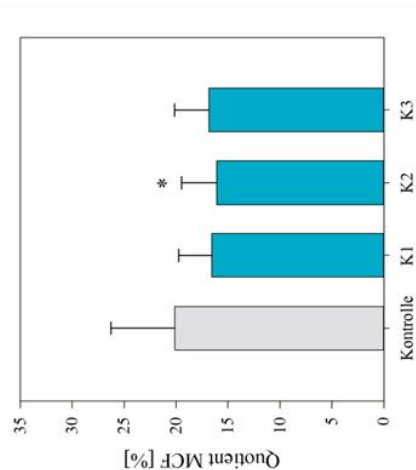
Hyaluronan



Quotient MCF FIBTEM/EXTEM



Quotient MCF FIBTEM/EXTEM



Quotient MCF FIBTEM/EXTEM

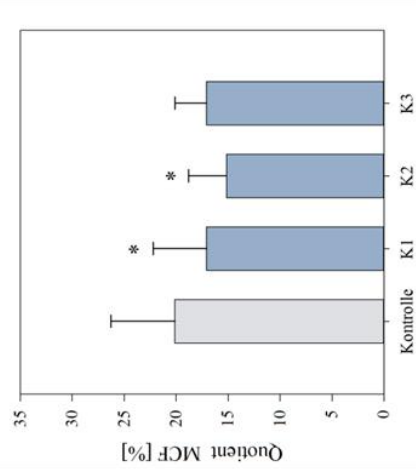


Abbildung 22 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der ROTEM-Messparameter Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximale Gerinnselfestigkeit für (MCF) als Quotienten der Messungen im EXTEM und FIBTEM in [%] für die mit Heparansulfat (links), Syndecan-1 (Mitte) und Hyaluronan (rechts) inkubierten Testproben. Zum Vergleich sind die Werte der Kontrollproben in grau gegenübergestellt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert (N = 10, * p < 0,05 vs. Kontrolle). Die Skalierungen entsprechen den vom Hersteller angegebenen Referenzbereichen.

3.4.6. Vergleich INTEM/HEPTEM

Um etwaige heparinartige Einflüsse auf die intrinsische Gerinnung zu erkennen, wurden die INTEM- und HEPTEM-Messungen miteinander verglichen.

3.4.6.1. INTEM/HEPTEM Kontrollproben

Die Kontrollproben der Probanden lagen im Mittelwert für alle gemessenen Parameter im vom Hersteller definierten INTEM-Referenzbereich (siehe 6.3 Referenzwerte ROTEM®). Es zeigten sich allerdings insbesondere für die Clotting Time (CT) ein erheblicher Unterschied zwischen INTEM- ($186,8 \pm 18,0$ s) und HEPTEM-Messung ($206,9 \pm 36,5$ s). Um einen etwaigen heparinartigen Einfluss der Testsubstanzen zeigen zu können, wurde die Differenz $\Delta CT = CT_{INTEM} - CT_{HEPTEM} = -20,1 \pm 25,8$ s gleich Null gesetzt. Mit den Differenzen sämtlicher gemessener Kontrollwerte wurde gleichermaßen verfahren. In Tabelle 25 auf Seite 74 sind in der Spalte „MW“ (Mittelwerte) die Differenzen der Mittelwerte gelistet, in Spalte „MWA“ (angepasste Mittelwerte) die Differenzen der Mittelwerte nach Null-Setzen der Kontrollen.

3.4.6.2. INTEM/HEPTEM Heparansulfat

Die Differenz der Clotting Time (ΔCT) war für alle Heparansulfat-Konzentrationen deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht. Für K2 ($MWA = 49,2 \pm 29,2$ s) und K3 ($MWA = 40,1 \pm 26,9$ s) war dieser Unterschied signifikant. Die Differenz der Clot Formation Time (ΔCFT) zeigte für alle Heparansulfat-Konzentrationen marginale Schwankungen um den Kontrollwert ($MW = -4,7 \pm 9,6$ s; $MWA = 0,0 \pm 9,6$ s). Ein signifikanter Unterschied ergab sich für keine Konzentration. Auch für die Differenz der Alphawinkel ($\Delta \alpha$) zeigten sich für alle Heparansulfat-Konzentrationen minimale Schwankungen um den Kontrollwert ($MW = -1,0 \pm 2,1$; $MWA = 0,0 \pm 2,1$). Ein signifikanter Unterschied ergab sich für keine Konzentration. Sowohl für die Differenz der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten ($\Delta A10$; $MW = -1,6 \pm 2,0$; $MWA = 0,0 \pm 2,0$), als auch für die Differenz der maximale Gerinnselfestigkeit (ΔMCF ; $MW = -1,3 \pm 1,9$; $MWA = 0,0 \pm 1,9$) ergaben sich minimale Schwankungen um die Kontrollwerte. Diese waren nicht signifikant. Die maximale Lyse (ML) blieb für alle Konzentrationen nahezu konstant. Die Diagramme in Abbildung 23 auf Seite 75 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

3.4.6.3. INTEM/HEPTEM Syndecan-1

Die Differenz der Clotting Time (ΔCT) war für alle Syndecan-1-Konzentrationen leicht gegenüber der Kontrolle erhöht. K2 wies mit $MWA = 9,5 \pm 24,4$ den höchsten Wert auf, signifikant war keiner der Werte im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Die Differenz der Clot

Formation Time (ΔCFT) zeigte für alle Syndecan-1-Konzentrationen marginale Schwankungen um den Kontrollwert ($MW = -4,7 \pm 9,6$; $MWA = 0,0 \pm 9,6$). Ein signifikanter Unterschied ergab sich für keine Konzentration. Auch für die Differenz der Alphawinkel ($\Delta \alpha$) zeigten sich für alle Syndecan-1-Konzentrationen minimale Schwankungen um den Kontrollwert ($MW = -1,0 \pm 2,1$; $MWA = 0,0 \pm 2,1$). Ein signifikanter Unterschied ergab sich für keine Konzentration. Sowohl für die Differenz der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten ($\Delta A10$; $MW = -1,6 \pm 2,0$; $MWA = 0,0 \pm 2,0$), als auch für die Differenz der maximale Gerinnselfestigkeit (ΔMCF ; $MW = -1,3 \pm 1,9$; $MWA = 0,0 \pm 1,9$) ergaben sich minimale Schwankungen um die Kontrollwerte. Diese waren nicht signifikant. Die maximale Lyse (ML) blieb für alle Konzentrationen nahezu konstant. Die Diagramme in Abbildung 24 auf Seite 76 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

3.4.6.4. *INTEM/HEPTEM Hyaluronan*

Die Differenz der Clotting Time (ΔCT) war für alle Hyaluronan-Konzentrationen deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht. K2 ($MWA = 33,1 \pm 19,0$) war gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht und wies zugleich den höchsten Wert auf. Die Differenz der Clot Formation Time (ΔCFT) zeigte für alle Hyaluronan-Konzentrationen leichte Schwankungen um den Kontrollwert ($MW = -4,7 \pm 9,6$; $MWA = 0,0 \pm 9,6$). Ein signifikanter Unterschied ergab sich für keine Konzentration. Auch für die Differenz der Alphawinkel ($\Delta \alpha$) zeigten sich für alle Hyaluronan-Konzentrationen minimale Schwankungen um den Kontrollwert ($MW = -1,0 \pm 2,1$; $MWA = 0,0 \pm 2,1$). Ein signifikanter Unterschied ergab sich für keine Konzentration. Sowohl für die Differenz der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten ($\Delta A10$; $MW = -1,6 \pm 2,0$; $MWA = 0,0 \pm 2,0$), als auch für die Differenz der maximale Gerinnselfestigkeit (ΔMCF ; $MW = -1,3 \pm 1,9$; $MWA = 0,0 \pm 1,9$) ergaben sich kleinere Schwankungen um die Kontrollwerte. Diese waren nicht signifikant. Die maximale Lyse (ML) blieb für alle Konzentrationen nahezu konstant. Die Diagramme in Abbildung 25 auf Seite 77 dienen der bildlichen Veranschaulichung.

Datentabelle Δ INTEM/HEPTEM

	Δ CT				Δ CFT				Δ A10				Δ MCF				Δ α				Δ ML			
	CT _{INTEM} - CT _{HEPTEM}				CFT _{INTEM} - CFT _{HEPTEM}				A10 _{HEPTEM} - A10 _{INTEM}				MCF _{HEPTEM} - MCF _{INTEM}				α _{HEPTEM} - α _{INTEM}				ML _{INTEM} - ML _{HEPTEM}			
	MW	MWA	SD	p	MW	MWA	SD	p	MW	MWA	SD	p	MW	MWA	SD	p	MW	MWA	SD	p	MW	MWA	SD	p
Kontrolle	-20,1	0,0	25,8		-4,7	0,0	9,6		-1,6	0,0	2,0		-1,3	0,0	1,9		-1,0	0,0	2,1		-0,3	0,0	1,1	
HS K1	11,7	31,8	30,4	n.s.	-2,3	2,4	7,8	n.s.	-2,6	-1,0	2,0	n.s.	-2,8	-1,5	2,6	n.s.	-0,1	0,9	2,2	n.s.	-1,4	-1,1	2,9	n.s.
HS K2	29,1	49,2	29,2	<0,05	-3,8	0,9	9,7	n.s.	-2,1	-0,5	1,6	n.s.	-2,5	-1,2	2,2	n.s.	-0,4	0,6	1,9	n.s.	-0,8	-0,5	1,1	n.s.
HS K3	20,0	40,1	26,9	<0,05	-8,3	-3,6	20,1	n.s.	-2,5	-0,9	1,1	n.s.	-3,0	-1,7	1,7	n.s.	-1,2	-0,2	3,8	n.s.	-1,0	-0,7	1,0	n.s.
SY K1	-13,9	6,2	11,8	n.s.	-6,2	-1,5	16,4	n.s.	-1,7	-0,1	2,3	n.s.	-2,2	-0,9	2,4	n.s.	-0,8	0,2	3,1	n.s.	-0,9	-0,6	2,2	n.s.
SY K2	-10,6	9,5	24,4	n.s.	-1,9	2,8	8,2	n.s.	-1,3	0,3	1,1	n.s.	-1,4	-0,1	1,4	n.s.	-0,6	0,4	1,3	n.s.	-0,9	-0,6	1,5	n.s.
SY K3	-17,1	3,0	37,1	n.s.	-4,0	0,7	14,2	n.s.	-2,1	-0,5	2,6	n.s.	-2,9	-1,6	2,3	n.s.	-0,6	0,4	3,2	n.s.	-0,5	-0,2	1,4	n.s.
HA K1	-4,4	15,7	18,8	n.s.	-11,6	-6,9	11,8	n.s.	-3,7	-2,1	2,9	n.s.	-3,8	-2,5	2,6	n.s.	-1,6	-0,6	2,2	n.s.	-0,6	-0,3	1,2	n.s.
HA K2	13,0	33,1	19,0	<0,05	-1,9	2,8	9,6	n.s.	-2,7	-1,1	3,2	n.s.	-4,3	-3,0	6,3	n.s.	0,3	1,3	2,1	n.s.	-2,0	-1,7	8,2	n.s.
HA K3	9,4	29,5	26,5	n.s.	-9,2	-4,5	29,8	n.s.	-1,7	-0,1	2,8	n.s.	-5,4	-4,1	13,8	n.s.	-1,6	-0,6	5,9	n.s.	-4,6	-4,3	16,5	n.s.

Tabelle 25 zeigt Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), des alpha-Winkels und der maximalen Lyse (ML) als Differenzen der Messungen im INTEM und HEPTEM. Unter der Annahme, dass die Werte sich in INTEM und HEPTEM in den Kontrollproben nicht unterscheiden, wurden die Differenzen der Kontrollmessungen gleich Null gesetzt und die Mittelwerte der Testproben entsprechend angepasst (angepasster Mittelwert = MWA). Die Werte wurden für die Kontrollproben, sowie die mit den Konzentrationen K1, K2 und K3 der Testsubstanzen Heparansulfat (HS), Syndecan 1 (SY) und Hyaluronan (HA) inkubierten Proben erfasst. Der p-Wert zeigt signifikante Unterschiede der Testproben zu den Kontrollproben (N = 10; n.s. = nicht signifikant)

Vergleich INTEM vs. HEPTEM: Heparansulfat

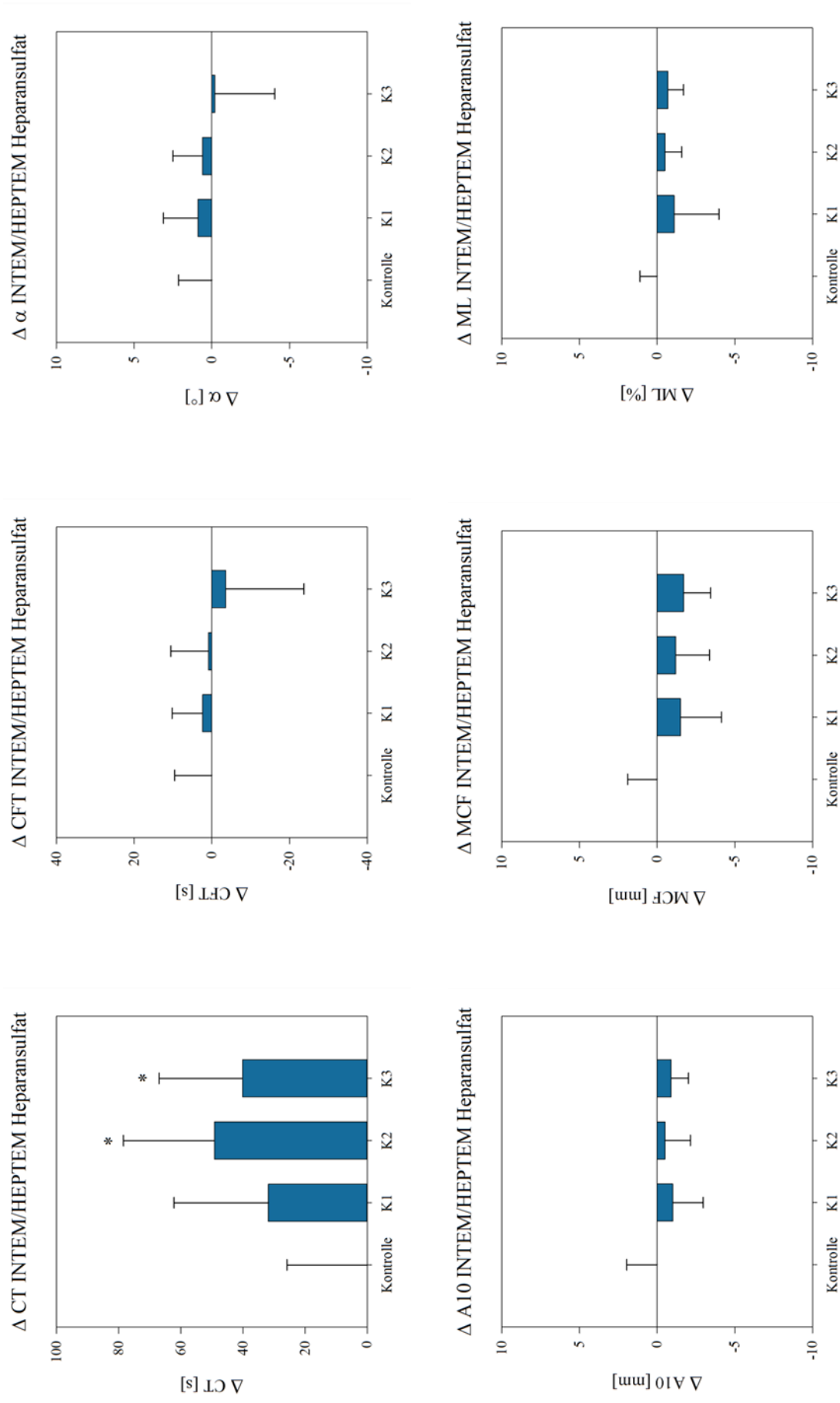


Abbildung 23 zeigt angepasste Mittelwerte und Standardabweichungen der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), des alpha-Winkels, der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), sowie der maximalen Lyse (ML) als Differenz der Messungen im INTEM und HEPTEM für die mit Heparansulfat inkubierten Testproben. Die Differenzen der Kontrollproben wurden gleich Null gesetzt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert (N = 10, * p < 0,05 vs. Kontrolle).

Vergleich INTEM vs. HEPTEM: Syndecan-1

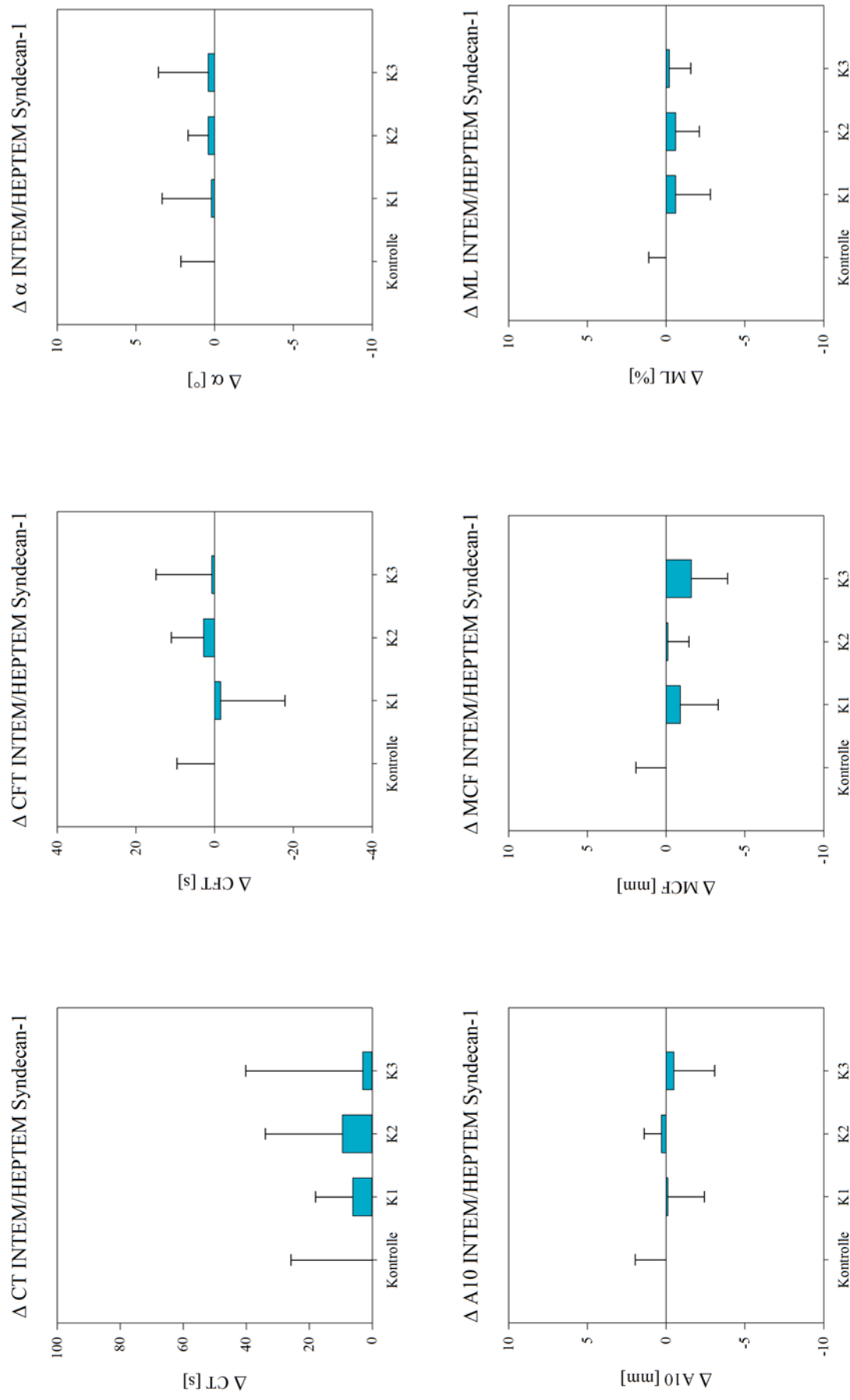


Abbildung 24 zeigt angepasste Mittelwerte und Standardabweichungen der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), des alpha-Winkels, der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), sowie der maximalen Lyse (ML) als Differenz der Messungen im INTEM und HEPTEM für die mit Syndecan-1 inkubierten Testproben. Die Differenzen der Kontrollproben wurden gleich Null gesetzt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert (N = 10, * p < 0,05 vs. Kontrolle).

Vergleich INTEM vs. HEPTEM: Hyaluronan

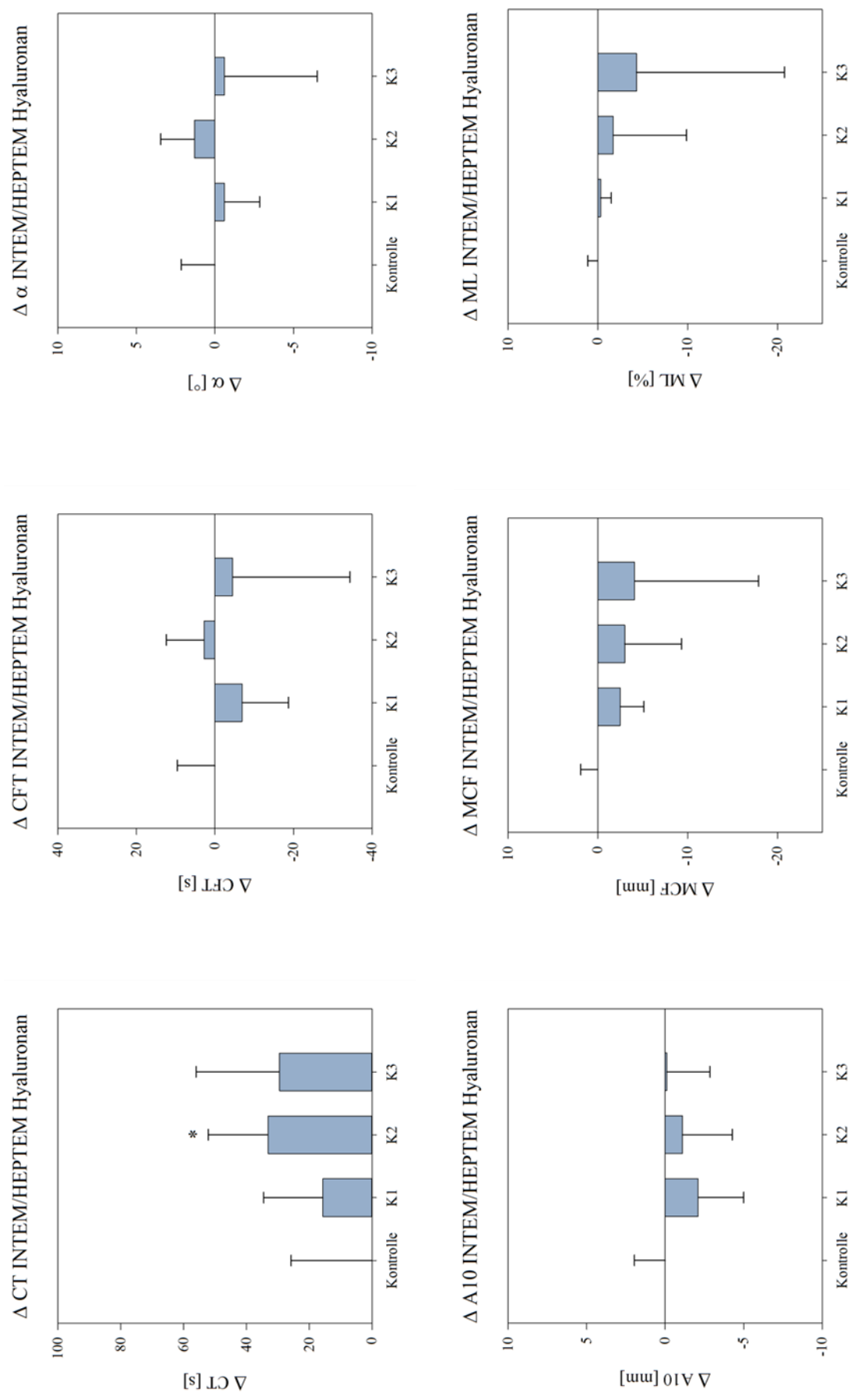


Abbildung 25 zeigt angepasste Mittelwerte und Standardabweichungen der ROTEM-Messparameter Clotting Time (CT), Clot Formation Time (CFT), des alpha-Winkels, der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), sowie der maximalen Lyse (ML) als Differenz der Messungen im INTEM und HEPTEM für die mit Hyaluronan inkubierten Testproben. Die Differenzen der Kontrollproben wurden gleich Null gesetzt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben sind mit * markiert (N = 10, * p < 0,05 vs. Kontrolle).

3.4.7. Summierter Effekt der Glykokalyx-Bestandteile auf die Gerinnung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte der Glykokalyx-Bestandteile Heparansulfat, Syndecan-1 und Hyaluronan auf die Hämostase in separaten Ansätzen gemessen, um die Effekte pro Substanz zeigen zu können. In vivo sind allerdings alle drei Substanzen zugleich im Blut vorhanden und beeinflussen die Hämostase somit gemeinsam. Um eine Vorstellung des kombinierten Effekts der verschiedenen Glykokalyx-Bestandteile auf die Hämostase zu bekommen, wurden die in der Rotationsthrombelastometrie gemessenen Effekte im Folgenden summiert. Hierzu wurden in allen Messungen Differenzen zwischen Kontroll- und Testmessungen gebildet und signifikante Differenzen aller Substanzen jeweils für die in 2.2 definierten Konzentrationen K1, K2 und K3 addiert. Es zeigte sich für sämtliche Messparameter, die Zeit bis Gerinnselbildung (CT), die Gerinnselbildung (CFT und alpha), die Gerinnselqualität nach 10 Minuten und maximal (A10 und MCF), sowie die maximale Lyse (ML), dass die Veränderungen der Messparameter für alle drei Testsubstanzen gleichgerichtet waren. Es fand also keine Verminderung des Effektes eines Testansatzes durch einen entgegengerichteten Effekt eines anderen Testansatzes statt.

3.4.7.1. Zeit zur Gerinnselbildung (CT)

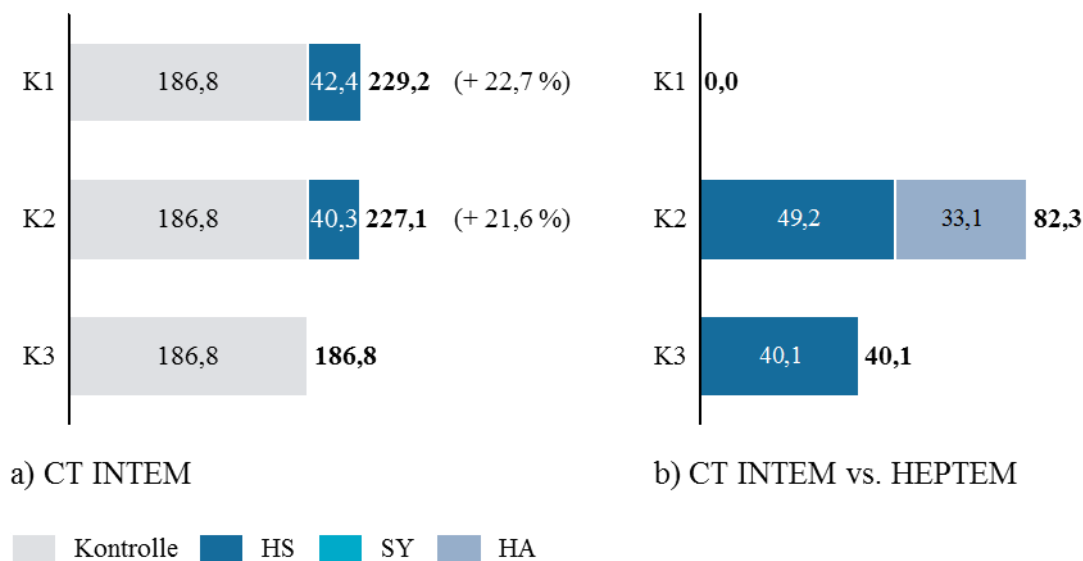


Abbildung 26 Veränderungen der Clotting Time unter dem summierten Einfluss der Glykokalyx-Bestandteile Heparansulfat (HS), Syndecan-1 (SY) und Hyaluronan (HA). Ausschließlich signifikante Veränderungen sind dargestellt. a) INTEM b) Vergleich INTEM vs. HEPTEM (delta der Mittelwerte INTEM minus HEPTEM, adjustiert: delta der Kontrollwerte wurde gleich Null gesetzt); alle Werte in [s]; summierte Veränderungen im Verhältnis zur Kontrolle in [%]

Die Zeit bis zur Gerinnselbildung war ausschließlich auf dem intrinsischen Gerinnungsweg verändert. Für K1 und K2 zeigte sich unter dem Einfluss von Heparansulfat eine Verlängerung der Clotting Time im INTEM um 22,7 % (42,4 s) beziehungsweise 21,6 % (40,3 s) (siehe Abbildung 26 a). Für K3 zeigte sich keine signifikante Verlängerung.

Im Vergleich INTEM vs. HEPTEM zeigten sich für K2 und K3 deutliche Differenzen der Clotting Times (INTEM größer HEPTEM), hauptsächlich unter dem Einfluss von Heparansulfat (K2: 49,2 s, K3 40,1 s) aber auch von Hyaluronan (K2: 33,1 s) (siehe Abbildung 26 b). Dies lässt sich als Effekt der im HEPTEM-Ansatz enthaltenen Heparinase werten, die den gerinnungshemmenden Effekt von Heparansulfat teilweise antagonisiert.

3.4.7.2. Gerinnungsbildung (CFT und alpha-Winkel)

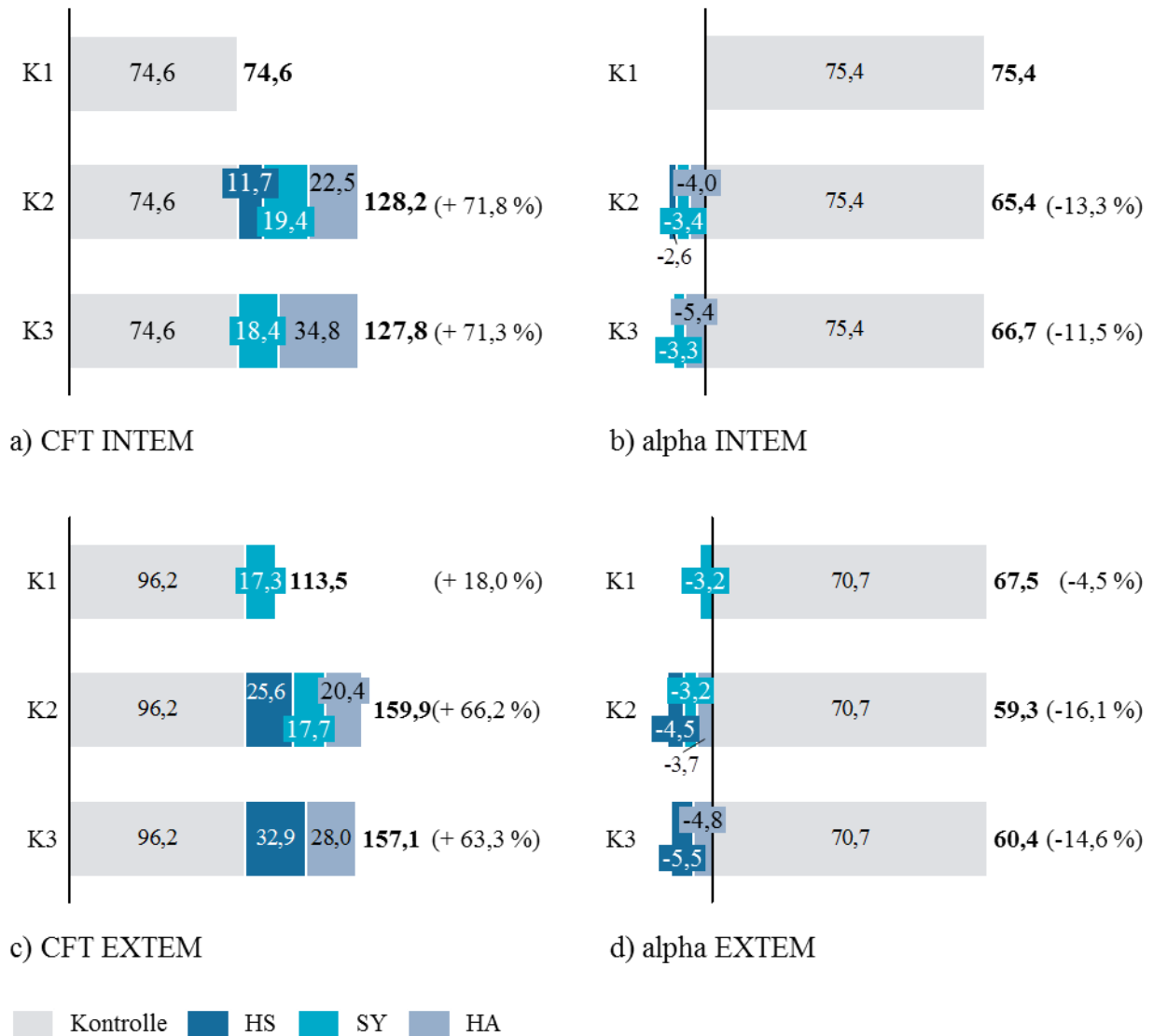


Abbildung 27 Veränderungen der Clot Formation Time (a, c); Werte in [s] und des alpha-Winkels (b, d); Werte in [°] unter dem summierten Einfluss der Glykokalyx-Bestandteile Heparansulfat (HS), Syndecan-1 (SY) und Hyaluronan (HA). Ausschließlich signifikante Veränderungen sind dargestellt. Summierte Veränderungen im Verhältnis zur Kontrolle in [%]
a) und b) INTEM
c) und d) EXTEM

Die Gerinnungsbildung war sowohl im EXTEM als auch im INTEM verzögert, ersichtlich in einer verlängerten Clot Formation Time und einem abflachenden Alpha-Winkel. Für die **Konzentrationen K1** zeigte sich keine signifikante Veränderung im INTEM, im EXTEM

zeigte sich unter dem Einfluss von Syndecan-1 eine Verlängerung der CFT um 18,0 % (17,3 s) und ein Abflachen des alpha-Winkels um 4,5 % (3,2°). Für die **Konzentrationen K2** zeigten sich im INTEM und EXTEM signifikante Veränderungen von CFT und alpha-Winkel für alle drei Substanzen: Im INTEM war die CFT summiert um 71,8 % (53,6 s) verlängert, der alpha-Winkel um 13,3 % (10,0°) abgeflacht. Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Heparansulfat (CFT: + 15,7 % (+11,7 s); alpha: -3,4 % (-2,6°)), Syndecan-1 (CFT: + 26,0 % (+19,4 s); alpha: -4,5 % (-3,4°)) und Hyaluronan (CFT: + 30,2 % (+22,5 s); alpha: -5,3 % (-4,0°)). Im EXTEM war die CFT summiert um 66,2 % (63,7 s) verlängert, der alpha-Winkel um 16,1 % (11,4°) abgeflacht. Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Heparansulfat (CFT: + 26,6 % (+25,6 s); alpha: -6,4 % (-4,5°)), Syndecan-1 (CFT: + 18,4 % (+17,7 s); alpha: -4,5 % (-3,2°)) und Hyaluronan (CFT: + 21,2 % (+20,4 s); alpha: -5,2 % (-3,7°)). Für die **Konzentrationen K3** zeigten sich im INTEM signifikante Veränderungen von CFT und alpha-Winkel unter Einfluss von Syndecan-1 und Hyaluronan, im EXTEM von Heparansulfat und Hyaluronan: Im INTEM war die CFT summiert um 71,3 % (53,2 s) verlängert, der alpha-Winkel um 11,5 % (8,7°) abgeflacht. Die Veränderungen wurden unter dem Einfluss von Syndecan-1 (CFT: + 24,7 % (+18,4 s); alpha: -4,4 % (-3,3°)) und Hyaluronan (CFT: + 46,6 % (+34,8 s); alpha: -7,2 % (-5,4°)) beobachtet. Im EXTEM war die CFT summiert um 63,3 % (60,9 s) verlängert, der alpha-Winkel um 14,6 % (10,3°) abgeflacht. Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Heparansulfat (CFT: + 34,2 % (+32,9 s); alpha: -7,8 % (-5,5°)) und Hyaluronan (CFT: + 29,1 % (+28,0 s); alpha: -6,8 % (-4,8°)). Abbildung 27 dient der graphischen Veranschaulichung.

3.4.7.3. Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten und maximal (A10 und MCF)



Abbildung 28 Veränderungen der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10: a), c); Werte in [mm]) und der maximalen Gerinnselfestigkeit (MCF: b), d); Werte in [mm]) unter dem summierten Einfluss der Glykokalyx-Bestandteile Heparansulfat (HS), Syndecan-1 (SY) und Hyaluronan (HA). Ausschließlich signifikante Veränderungen sind dargestellt. Summierte Veränderungen im Verhältnis zur Kontrolle in [%]

a) und b) INTEM

c) und d) EXTEM

Die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten, sowie die maximale Gerinnselfestigkeit nahmen summiert sowohl im INTEM als auch im EXTEM mit steigenden Substanzkonzentrationen kontinuierlich ab. Für die **Konzentrationen K1** zeigten sich im INTEM und EXTEM signifikante Veränderungen von A10 und MCF unter dem Einfluss von Syndecan-1. Im INTEM zeigte sich eine Abnahme der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten um 5,6 % (3,0 mm), sowie der maximalen Gerinnselfestigkeit um 4,6 % (2,7 mm). Im EXTEM zeigte sich eine Abnahme der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten um 9,7 % (5,3 mm), sowie der maximalen Gerinnselfestigkeit um 7,8 % (4,8 mm). Für die **Konzentrationen K2**

zeigten sich im INTEM und EXTEM signifikante Veränderungen von A10 und MCF: Im INTEM war die A10 summiert um 20,8 % (11,1 mm) vermindert. Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Heparansulfat (−4,9 % (−2,6 mm)), Syndecan-1 (−7,7 % (−4,1 mm)) und Hyaluronan (−8,2 % (−4,4 mm)). Die MCF im INTEM war unter dem Einfluss von Syndecan-1 um 6,2 % (3,6 mm) vermindert. Im EXTEM war die A10 summiert um 27,9 % (15,2 mm) vermindert. Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Heparansulfat (−10,1 % (−5,5 mm)), Syndecan-1 (−8,6 % (−4,7 mm)) und Hyaluronan (−9,2 % (−5,0 mm)). Die MCF war im EXTEM summiert um 14,5 % (8,9 mm) vermindert. Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Heparansulfat (−7,5 % (−4,6 mm)) und Syndecan-1 (−7,0 % (−4,3 mm)). Für die **Konzentrationen K3** zeigten sich im im INTEM und EXTEM signifikante Veränderungen von A10 und MCF: Im INTEM war die A10 summiert um 21,7 % (11,6 mm) vermindert. Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Syndecan-1 (−6,0 % (−3,2 mm)) und Hyaluronan (−15,7 % (−8,4 mm)). Die MCF im INTEM war unter dem Einfluss von Hyaluronan um 11,1 % (6,5 mm) vermindert. Im EXTEM war die A10 summiert um 33,6 % (18,3 mm) vermindert. Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Heparansulfat (−12,3 % (−6,7 mm)), Syndecan-1 (−7,0 % (−3,8 mm)) und Hyaluronan (−14,3 % (−7,8 mm)). Die MCF war im EXTEM summiert um 20,8 % (12,8 mm) vermindert. Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Heparansulfat (−9,4 % (−5,8 mm)) und Hyaluronan (−11,4 % (−7,0 mm)). Abbildung 28 dient der graphischen Veranschaulichung. Die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten, sowie die maximale Gerinnselfestigkeit im reinen Fibringerinnsel (FIBTEM) waren summiert für alle drei Konzentrationen signifikant vermindert. Für die **Konzentrationen K1** zeigte sich eine summierte Abnahme der A10 um 40,5 % (4,9 mm). Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Syndecan-1 (−23,1 % (−2,8 mm)) und Hyaluronan (−17,4 % (−2,1 mm)). Die MCF zeigte eine summierte Abnahme um 39,5 % (4,9 mm). Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Syndecan-1 (−23,4 % (−2,9 mm)) und Hyaluronan (−16,1 % (−2,0 mm)). Für die **Konzentrationen K2** zeigte sich eine summierte Abnahme der A10 um 79,3 % (9,6 mm). Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Heparansulfat (−24,8 % (−3,0 mm)), Syndecan-1 (−26,4 % (−3,2 mm)) und Hyaluronan (−28,1 % (−3,4 mm)). Die MCF zeigte eine summierte Abnahme um 75,0 % (9,3 mm). Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Heparansulfat (−22,6 % (−2,8 mm)), Syndecan-1 (−25,0 % (−3,1 mm)) und Hyaluronan (−27,4 % (−3,4 mm)). Für die **Konzentrationen K3** zeigte sich eine summierte Abnahme

der A10 um 49,6 % (6,0 mm). Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Heparansulfat (−23,1 % (−2,8 mm)) und Hyaluronan (−26,4 % (−3,2 mm)). Die MCF zeigte eine summierte Abnahme um 46,8 % (5,8 mm). Die Veränderungen zeigten sich unter dem Einfluss von Heparansulfat (−22,6 % (−2,8 mm)) und Hyaluronan (−24,2 % (−3,0 mm)).



Abbildung 29 Veränderungen der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten im FIBTEM (a); Werte in [mm]) und als Fibrinanteil am Gesamtgerinnsel (Quotient FIBTEM/EXTEM c))
Veränderungen der maximalen Gerinnselfestigkeit im FIBTEM (b); Werte in [mm]) und als Fibrinanteil am Gesamtgerinnsel (Quotient FIBTEM/EXTEM d))
Alle Veränderungen unter dem summierten Einfluss der Glykokalyx-Bestandteile Heparansulfat (HS), Syndecan-1 (SY) und Hyaluronan (HA). Ausschließlich signifikante Veränderungen sind dargestellt. Summierte Veränderungen im Verhältnis zur Kontrolle in [%]

Der **Fibrinanteil am Gesamtgerinnsel** (Quotient FIBTEM/EXTEM) war signifikant nicht für alle Konzentrationen verändert. Der Quotient war für die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten war für die Konzentrationen 2 summiert um 9,4 Prozentpunkte auf 12,9 %

vermindert. Diese Veränderung zeigte sich unter dem Einfluss von Syndecan-1 (−4,5 %) und Hyaluronan (−4,8 %). Der Quotient für die maximale Gerinnselfestigkeit war für Hyaluronan der Konzentration 1 um 3,1 Prozentpunkte auf 17,0 % vermindert, für die Konzentrationen 2 summiert um 9,0 Prozentpunkte auf 11,1 %. Diese Veränderung zeigte sich unter dem Einfluss von Syndecan-1 (−4,0 %) und Hyaluronan (−5,0 %). Abbildung 29 dient der graphischen Veranschaulichung.

3.4.7.4. Maximale Lyse



Abbildung 30 Summierte Veränderungen der maximalen Lyse durch Glykokalyx-Bestandteile; alle Werte in [%] im Verhältnis zur MCF

Eine signifikante Veränderung der maximalen Lyse zeigte sich sowohl im INTEM als auch im EXTEM nur unter dem Einfluss von Hyaluronan der **Konzentration 3**: die maximale Lyse war im INTEM um 3,9 Prozentpunkte auf 5,6 % vermindert, im EXTEM um 3,3 Prozentpunkte auf 4,9 %. Abbildung 30 dient der graphischen Veranschaulichung.

4. Diskussion

4.1. Individueller Effekt der Testsubstanzen auf die Gerinnung

4.1.1. Heparansulfat

In den **hämostaseologischen Globaltests** zeigten sich für die Testproben, die mit Heparansulfat der Konzentration K3 inkubiert worden waren, erhebliche und signifikante ($p < 0,05$) Veränderungen der intrinsischen Gerinnungsparameter. So war die aPTT (55 ± 10 s vs. 28 ± 2 s Kontrolle) fast verdoppelt, die aPTT-Ratio ($2,0 \pm 0,4$ vs. $1,0 \pm 0,1$) verdoppelt und die Thrombinzeit (146 ± 14 s vs. 20 ± 2 s) um mehr als das Sechsfache erhöht. Für die extrinsischen Gerinnungsparameter Quick und INR ergaben sich keine signifikanten Änderungen. Zusammenfassend kann man die Veränderungen unter dem Einfluss von Heparansulfat K3 als deutlichen heparinartigen Effekt bezeichnen. Der heparinartige Einfluss von Heparansulfat bestätigte sich auch in der **Rotationsthrombelastometrie**: die Clotting Time war im Vergleich der Messungen im INTEM und HEPTEM für alle Konzentrationen deutlich verlängert, für K2 ($MWA = 49,2 \pm 29,2$ s) und K3 ($MWA = 40,1 \pm 26,9$ s) war dieser Unterschied signifikant ($p < 0,05$). Im INTEM war die Clotting Time für die Konzentrationen K1 ($229,2 \pm 35,4$ s) und K2 ($227,1 \pm 32,0$) hoch signifikant verlängert, K3 zeigte keine signifikante Verlängerung zur Kontrolle ($192,2 \pm 14,0$ s K3 vs. $186,8 \pm 18,0$ s Kontrolle). Im EXTEM zeigte sich mit steigenden Heparansulfat-Konzentrationen eine kontinuierlich verzögerte Gerinnselfbildung ersichtlich an der Clot Formation Time ($129,1 \pm 19,7$ s K3 vs. $96,2 \pm 15,4$ s Kontrolle) und einem abflachenden alpha-Winkel ($65,2 \pm 3,9^\circ$ K3 vs. $70,7 \pm 3,1^\circ$ Kontrolle). Die Gerinnselfestigkeit verschlechterte sich ebenfalls kontinuierlich nach 10 Minuten ($A10: 47,7 \pm 5,5$ mm K3 vs. $54,4 \pm 5,1$ mm Kontrolle) und auch maximal (MCF: $55,6 \pm 5,5$ mm K3 vs. $61,4 \pm 4,8$ mm Kontrolle). All diese Veränderungen waren für die Heparansulfat-Konzentrationen K2 und K3 signifikant ($p < 0,05$). Für die ebenfalls mit steigender Heparansulfat-Konzentration kontinuierliche Abnahme der Clotting Time ($55,8 \pm 9,6$ s K3 vs. $64,4 \pm 16,0$ s Kontrolle) konnte keine Signifikanz gezeigt werden. Der Vergleich der Gerinnselfestigkeiten der Heparansulfat-Proben in FIBTEM und EXTEM nach 10 Minuten ($Quotient A10 = \frac{A10_{FIBTEM}}{A10_{EXTEM}}$; Kontrolle: $22,2 \pm 6,8$ %) und maximal ($Quotient MCF = \frac{MCF_{FIBTEM}}{MCF_{EXTEM}}$; Kontrolle: $20,1 \pm 6,2$ %) zeigte keine signifikanten Veränderungen des Anteils der Thrombozyten am Gesamtgerinnsel.

4.1.2. Syndecan-1

In den **hämostaseologischen Globaltests** zeigten sich für die Testproben, die mit Syndecan-1 der Konzentration K3 inkubiert worden waren, keinerlei signifikante Veränderungen der intrinsischen und extrinsischen Parameter. Die Syndecan-1-Proben zeigten in der **Rotationsthrombelastometrie** sowohl im EXTEM als auch im INTEM eine verzögerte Gerinnelsbildung und eine verschlechterte Gerinnselfestigkeit im Vergleich zu den Kontrollproben. Eine proportionale Verschlechterung mit steigender Syndecan-1-Konzentration konnte allerdings nicht gezeigt werden. So war im EXTEM die Gerinnelsbildung für K1 und K2 signifikant verschlechtert (CFT: $113,9 \pm 23,6$ s K2 vs. $96,2 \pm 15,4$ s Kontrolle; alpha-Winkel: $67,5 \pm 4,0^\circ$ K2 vs. $70,7 \pm 3,1^\circ$ Kontrolle; jeweils $p < 0,05$). Die Gerinnselqualität war nach 10 Minuten für alle Konzentrationen und maximal für K1 und K2 signifikant verschlechtert. Im INTEM war die Gerinnelsbildung (CFT und alpha-Winkel) für K2 und K3 signifikant verschlechtert, die Gerinnselqualität nach 10 Minuten für alle Konzentrationen und maximal für K1 und K2 (jeweils $p < 0,05$).

Im Vergleich INTEM versus HEPTTEM ergaben sich keine signifikanten Veränderungen für die Syndecan-1-Proben. Der Vergleich der Gerinnselfestigkeiten der Syndecan-1-Proben in FIBTEM und EXTEM nach 10 Minuten ($Quotient A10 = \frac{A10_{FIBTEM}}{A10_{EXTEM}}$; Kontrolle: $22,2 \pm 6,8$ %) und maximal ($Quotient MCF = \frac{MCF_{FIBTEM}}{MCF_{EXTEM}}$; Kontrolle: $20,1 \pm 6,2$ %) zeigte eine marginale Abnahme des Thrombozytenanteils am Gesamtgerinnsel. Signifikant war dieser Unterschied jeweils für Syndecan-1 der Konzentration K2 ($Quotient A10 = 17,6 \pm 3,4$ %; $Quotient MCF = 16,1 \pm 3,4$ %).

4.1.3. Hyaluronan

In den **hämostaseologischen Globaltests** zeigten sich für die Testproben, die mit Hyaluronan der Konzentration K3 inkubiert worden waren, keinerlei signifikante Veränderungen der intrinsischen und extrinsischen Parameter. In der **Rotationsthrombelastometrie** zeigten die mit Hyaluronan inkubierten Proben sowohl im EXTEM als auch im INTEM eine mit steigender Konzentration verzögerte Gerinnelsbildung und verschlechterte Gerinnselqualität. Im EXTEM war die Gerinnelsbildung (CFT und alpha-Winkel) für K2 und K3 signifikant verzögert. Die Gerinnselqualität nach 10 Minuten war für K2 und K3, die maximale Gerinnselqualität für K3 signifikant verschlechtert. Zusätzlich war die Maximale Lyse mit $4,9 \pm 3,1$ % für K3 signifikant gegenüber der Kontrolle ($8,2 \pm 2,3$ %) vermindert (jeweils $p < 0,05$). Im INTEM war die Gerinnelsbildung (CFT und alpha-Winkel) für K2 und K3 signifikant verzögert. Die Gerinnselqualität nach 10 Minuten war für K2 und K3, die

maximale Gerinnungsqualität für K3 signifikant verschlechtert. Zusätzlich war die Maximale Lyse mit $5,6 \pm 2,7 \%$ für K3 signifikant gegenüber der Kontrolle ($8,2 \pm 2,3 \%$) vermindert (jeweils $p < 0,05$). Im Vergleich der Messungen INTEM und HEPTEM war die Clotting Time für alle Konzentrationen deutlich verlängert, für K2 ($MWA = 33,1 \pm 19,0 \text{ s}$) war dieser Unterschied signifikant ($p < 0,05$). Der Vergleich der Gerinnselfestigkeiten der Hyaluronan-Proben in FIBTEM und EXTEM nach 10 Minuten ($Quotient A10 = \frac{A10_{FIBTEM}}{A10_{EXTEM}}$; Kontrolle: $22,2 \pm 6,8 \%$) und maximal ($Quotient MCF = \frac{MCF_{FIBTEM}}{MCF_{EXTEM}}$; Kontrolle: $20,1 \pm 6,2 \%$) zeigte eine marginale Abnahme des Thrombozytenanteils am Gesamtgerinnel. Signifikant war dieser Unterschied nach 10 Minuten für Hyaluronan der Konzentration K2 ($Quotient A10 = 17,3 \pm 3,4 \%$) und maximal für K1 ($Quotient MCF = 17,1 \pm 5,1 \%$) und K2 ($Quotient MCF = 15,2 \pm 3,6 \%$).

4.2. Glykokalyx-Bestandteile und ihr Einfluss auf die Hämostase

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Glykokalyx-Bestandteilen auf die Gerinnung zu untersuchen. Der klinischen Herangehensweise entsprechend wurden die mit den Substanzen Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluronan inkubierten Blutproben zunächst in hämostaseologischen Globaltests untersucht. Herangezogen wurden hierfür jeweils die höchsten in dieser Arbeit verwendeten Zielkonzentrationen K3. Hierbei zeigte sich ausschließlich für die mit Heparansulfat inkubierten Proben ein Effekt. Die intrinsischen Messwerte aPTT, aPTT-Ratio und die gemeinsame Endstrecke abbildende Thrombinzeit waren erheblich und signifikant erhöht, während die extrinsischen Werte INR und Quick im Vergleich zur Kontrolle unverändert blieben. Dies wies auf einen deutlichen heparinartigen Effekt von Heparansulfat hin. Die mit Syndecan-1 und Hyaluronan inkubierten Blutproben zeigten für keinen der Globaltests eine Veränderung gegenüber den Kontrollproben. Hämostaseologische Globaltests bilden Teile der Gerinnungskaskade ab, also den Weg der Gerinnungsaktivierung bis zum Beginn der Gerinnselektstehung. Sie sind damit geeignet, Pathologien in der Gerinnungsaktivierung zu detektieren und werden zum Monitoring von gerinnungshemmenden Substanzen wie Heparin (aPTT) und Phenprocoumon (Marcumar®; Quick) herangezogen. Aussagen über die Dynamik von Gerinnungsbildung und -auflösung sowie die Festigkeit eines Blutgerinnsels lassen die hämostaseologischen Globaltests nicht zu. Um einem möglichen Effekt der Glykokalyx-Bestandteile auf die Blutgerinnung in vivo näher zu kommen, wurde in der vorliegenden Arbeit das Verfahren der Rotationsthrombelastometrie (ROTEM®) angewandt. Die Ergebnisse untermauern die These eines heparinartigen Effektes durch Heparansulfat. So war die Clotting Time im INTEM unter

dem Einfluss von Heparansulfat der Konzentrationen K1 und K2 erheblich und signifikant verlängert. Für Heparansulfat der Konzentration K3 konnte keine Verlängerung gezeigt werden. Dieser ausbleibende Effekt könnte unter anderem an der sehr hohen Konzentration von Heparansulfat im Eppendorf-Gefäß und einer daraus resultierenden geringeren Löslichkeit im Blut liegen. Eventuell hätte ein längeres Durchmischen der Substanz mit dem Testblut zur adäquaten Durchmischung und einem entsprechenden Effekt auf die Clotting Time geführt. In den hämostaseologischen Globaltests wurden ausschließlich Substanzen der Konzentration K3 verwendet und hier zeigte sich, wie oben beschrieben, ein signifikanter heparinartiger Effekt für Heparansulfat. Für alle Konzentrationen von Heparansulfat zeigte sich keine signifikante Veränderung der Clotting Time im HEPTM, dies ist ein weiteres Indiz für die heparinartige Wirkung von Heparansulfat. Offensichtlich wurde das Heparansulfat durch die im HEPTM-Ansatz enthaltene Heparinase gespalten und damit der heparinartige Effekt antagonisiert. Einen heparinartigen Effekt von Heparansulfat und dessen Antagonisierung durch Heparinase-1 zeigten bereits Senzolo et al.: ausgehend von Danaparoid, das vor allem bei HIT-Patienten zur Thrombose-Prophylaxe eingesetzt wird, untersuchten sie den Effekt der darin enthaltenen Glykosaminoglykane Heparansulfat, Dermatansulfat und Chondroitinsulfat auf das Blut von 10 gesunden Probanden mittels Thrombelastographie (TEG) [64]. Neben Heparansulfat zeigten sie auch für Dermatansulfat einen heparinartigen Effekt, auch dieser war durch Heparinase-1 antagonisierbar. In der vorliegenden Arbeit war in den Kontrollmessungen die Clotting Time im HEPTM ($206,9 \pm 36,5$ s) im Mittelwert deutlich länger als im INTEM ($186,8 \pm 18,0$ s). Unter der Annahme, dass im Kontrollansatz kein heparinartiger oder antiheparinerger Effekt präsent sein sollte, wurde das Delta der Kontrollen ($20,1$ s) gleich Null gesetzt und die Mittelwerte der Testmessungen zur anschaulicheren grafischen Darstellung entsprechend angepasst. Einen ähnlichen Effekt hatten Senzolo et al. in ihrer Studie gesehen: die r-Zeit (entspricht CT im ROTEM) der Kontrollproben war im heparinaseTEG (entspricht HEPTM im ROTEM) mit $20,6$ s länger als im kaolinTEG mit $18,7$ s (entspricht INTEM im ROTEM). Die Ansätze im ROTEM und im TEG lassen sich zwar aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzung und Konzentrationen von Gerinnungsaktivatoren nicht in absoluten Zahlen vergleichen, prozentual entspricht die Verlängerung der r-Zeit im heparinaseTEG versus KaolinTEG (+10,2 %) allerdings annähernd der Verlängerung der CT im HEPTM versus INTEM (+10,8 %). Möglicherweise verzögert Heparinase also die Gerinnungsaktivierung. Zum Vergleich der Messparameter in TEG® und ROTEM® vergleiche auch Tabelle 26.

	TEG®	ROTEM®
Clotting Time (Zeit bis 2 mm Amplitude)	r (reaction time)	CT (Clotting Time)
Gerinnselbildungszeit (Zeit zwischen 2 mm und 20 mm Amplitude)	k (kinetics)	CFT (Clot Formation Time)
Alpha-Winkel	α (Linie zwischen r und k)	α (Tangente an CT)
Gerinnselfestigkeit (Amplitude) nach X Minuten	A (A30, A60)	A (A10, A15, A20, A25, A30)
Maximale Gerinnselfestigkeit	MA (maximale Amplitude)	MCF (Maximum Clot Firmness)
Lyse nach X Minuten	CL30, CL60	LY30, LY60
Maximale Lyse	-	ML

Tabelle 26 Vergleich von Messparametern im TEG® vs. ROTEM®, modifiziert nach [65]

Für Hyaluronan zeigte sich in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zwischen INTEM und HEPT-EM-Ansatz ebenfalls ein – allerdings kleinerer – heparinartiger Effekt in Form einer im INTEM im Vergleich zum HEPT-EM verlängerten Clotting Time. Dieser war allerdings nur für Hyaluronan der Konzentration K2 signifikant. Betrachtet man das Ausbleiben eines Effektes von Hyaluronan auf die hämostaseologischen Globaltests, so kann eventuell eine Verunreinigung von Hyaluronan mit Heparansulfat oder niedermolekularen, endogenen Heparinen als Ursache des milden heparinartigen Effekts infrage kommen. Das für die Tests verwendete Hyaluronan war aus Hahnenkamm isoliert und könnte daher Spuren anderer Glykosaminoglykane und Proteoglykane enthalten. Für das rekombinant hergestellte humane Syndecan-1 zeigte sich im Vergleich zwischen INTEM und HEPT-EM keinerlei heparinartiger Effekt. Betrachtet man für alle Substanzen die tendenziell mit steigenden Substanzkonzentrationen zunehmenden, aber in unterschiedlichem Maße signifikanten und nicht signifikanten Verzögerungen der Gerinnselbildung (Verlängerung der CFT, Abflachung des alpha-Winkels) und die Abnahme der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und maximal (MCF), so ist die Frage nach einer substanzspezifischen Kausalität nicht eindeutig zu beantworten. Um einen heparinartigen Einfluss auf die Blutgerinnung handelt es sich offenbar nicht, da sich die entsprechenden Messparameter für alle Substanzen im Vergleich der Messungen im INTEM und HEPT-EM nicht signifikant unterscheiden. Auch sollte eine Verzögerung der Gerinnselbildung und Abnahme der Gerinnselfestigkeit durch längere Probenlagerung erwogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Analysen an einem ROTEM® delta Analyse-Gerät durchgeführt und die Proben bis zur Messung im 37 °C-Wasserbad aufbewahrt. Es wurden zunächst die Kontrollproben, dann Heparansulfat in steigenden Konzentrationen, dann Syndecan-1 in steigenden Konzentrationen und schließlich

Hyaluronan in steigenden Konzentrationen gemessen. Für sich genommen blieben die jeweiligen Erhöhungen mit Ausnahme der Clot Formation Time unter dem Einfluss von Hyaluronan im HEPTEM im Mittel allesamt im vom Hersteller angegebenen Referenzbereich. Summiert man die unter dem Einfluss der jeweiligen Substanz gesehenen Veränderungen auf, wie am Ende des Ergebnisteils dargestellt, werden die Referenzbereiche regelmäßig überschritten. Um zu zeigen, ob es sich tatsächlich um Effekte der Glykokalyx-Bestandteile handelt und ob sich diese in der Zusammenwirkung von Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluronan addieren, sollten weitere Studien durchgeführt werden. Dafür sollten zum einen jeweils ein weiterer Testansatz mit Zugabe aller drei Testsubstanzen mittels ROTEM analysiert werden und zum anderen eine höhere Probandenzahl zum Einsatz kommen, um zufällig beobachtete Effekte zu minimieren. Auch sollten die Proben nach Möglichkeit gleichzeitig an verschiedenen, normierten ROTEM-Geräten durchgeführt werden, um eventuelle Effekte durch verlängerte Probenlagerung zu vermeiden.

Die Hämostase ist bei vielen kritisch Kranken beeinträchtigt, was zu gesteigerter Morbidität und Mortalität beiträgt [66]. Neben Thrombozytopenien und Verbrauchskoagulopathien ist in einigen Arbeiten der letzten beiden Jahrzehnte von ‚Endogener Heparinisierung‘ und ‚Autoheparinisierung‘ die Rede, also von einer in klinischen Tests als heparinartige Gerinnungsveränderung apparenten Koagulopathie im Blut von Patienten, die unter keiner gerinnungsbeeinflussenden Medikation stehen. Die Gruppe um Burroughs beschrieb in den 2000er Jahren in mehreren Studien heparinartige Effekte bei Zirrhose-Patienten mit bakterieller Infektion [67, 68], bei akuter Ösophagusvarizen-Blutung [69] und bei Patienten während Lebertransplantation [70]. In einer prospektiven Studie wurde das Blut von 60 Zirrhose-Patienten, davon 30 mit bakterieller Infektion, 30 ohne, sowie 5 bakteriell infizierten Nicht-Zirrhotikern mittels TEG untersucht [67]. Für 28 der 30 infizierten Zirrhotiker zeigte sich im Vergleich zwischen NativTEG und HeparinaseTEG eine signifikant längere r-Zeit, ein flacherer α -Winkel und eine geringere maximale Gerinnselfestigkeit MA im NativTEG, also ein heparinartiger Effekt, welcher durch Heparinase antagonisiert wurde. Bei den 30 nicht infizierten Zirrhotikern und den 5 infizierten Nicht-Zirrhotikern zeigte sich kein heparinartiger Effekt im TEG. Bei acht der während Infektion untersuchten Zirrhotiker wurde nach Abklingen der Infektion erneut eine TEG durchgeführt. Es zeigte sich kein heparinartiger Effekt mehr. Die im TEG gesehenen Effekte waren nicht in den hämostaseologischen Globaltests INR, PT und aPTT sichtbar: Sie unterschieden sich weder im Vergleich der Gruppen der infizierten und nicht infizierten Zirrhotiker, noch im Vergleich der infizierten Zirrhotiker während und nach Infektion signifikant. Montalto et al. postulierten

als mögliche Quellen des heparinartigen Effekts bei infizierten Zirrhotikern zum einen von Mastzellen während Inflammation sezerniertes Heparin, zum anderen von Endothelzellen synthetisierte „heparinartige Substanzen“. Eine verminderte hepatische Clearance von Heparin und heparinartigen Substanzen bei Zirrhotikern könnte eine Ursache sein, warum infizierte Nicht-Zirrhotiker keinen heparinartigen Effekt zeigten. Das Ausbleiben einer aPTT-Verlängerung bei verlängerter r-Zeit deutete für die Autoren darauf hin, dass der heparinartige Effekt durch niedermolekulare Heparine verursacht worden sein könnte, welche zwar im TEG sichtbare Effekte zeigen, die aPTT in anderen Studien aber nur minimal verändert hatten [71]. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, führten Zambruni et al. eine weitere Studie durch, in der sie das Blut von 30 Zirrhotikern, davon 15 bakteriell infiziert, 15 nicht, sowie 9 bakteriell infizierten Nicht-Zirrhotikern mit einem Anti-Xa-Ansatz untersuchten. In einer Subgruppe von 11 infizierten und 8 nicht-infizierten Zirrhotikern, sowie 8 infizierten Nicht-Zirrhotikern wurde zusätzlich eine TEG durchgeführt [68]: Bei 9 von 15 infizierten Zirrhotikern sowie bei 4 der 9 infizierten Nicht-Zirrhotiker wurde die Anti-Xa-Aktivität gemessen, was auf einen heparinartigen Effekt hindeutete. Nur bei einem der 15 nicht-infizierten Zirrhotiker war dies der Fall. Im TEG zeigten sich für die infizierten Zirrhotiker signifikante Heparinase-1-Effekte für k-Zeit, α -Winkel und r-Zeit. Bei den infizierten Nicht-Zirrhotikern zeigte sich ein signifikanter Heparinase-1-Effekt für die r-Zeit. Darüber hinaus zeigte sich für die infizierten Zirrhotiker eine signifikante Korrelation zwischen Anti-Xa-Konzentration und dem Heparinase-Effekt auf die r-Zeit, nicht aber den Effekten auf andere TEG-Parameter. Eine signifikante Korrelation zwischen Serum-Anti-Xa-Leveln und der r-Zeit zeigten auch Klein et al. in einer Studie, in der 24 chirurgische Patienten postoperativ zur Thromboembolie-Prophylaxe mit Enoxaparin behandelt worden waren und folgerten, dass die TEG möglicherweise ein Verfahren sein könnte, das mit dem Grad der durch niedermolekulare Heparine erwirkten Antikoagulation korreliert [72]. Zambruni et al. postulierten aus der Zusammenschau ihrer Ergebnisse und der Ergebnisse von Klein et al., dass die r-Zeit der sensitivste TEG-Parameter für heparinartige Substanzen sei. Die Arbeiten der Gruppe um Burroughs zeigten, dass bei kritisch Kranken Infizierten eine heparinartige Beeinträchtigung der Hämostase stattfindet.

Bei Patienten mit Sepsis findet ein Shedding der Glykokalyx statt, das heißt Bestandteile der Glykokalyx werden vom Endothel abgelöst und zirkulieren im Blut. Syndecan-1 gilt aufgrund seiner Verankerung in der Zellmembran des Endothels als ‚Backbone‘ der Glykokalyx und ein Nachweis erhöhter Syndecan-1-Werte im Blut wird als Marker für signifikante Glykokalyx-Schädigung sowie als Sepsis-Marker diskutiert [35, 40]. Auch bei Polytrauma-

Patienten findet eine Zerstörung der Glykokalyx statt. Erhöhte Syndecan-1-Werte bei schwerem Trauma und hämorrhagischem Schock zeigte die Gruppe um Kozar [73, 74]. Johansson et al. zeigten in einer Studie mit 75 post hoc blind ausgewählten Traumapatienten, dass erhöhte Syndecan-1-Level mit Inflammation, Koagulopathie und erhöhter Mortalität einhergingen [75]. Die Gruppe um Johansson postulierte eine durch Glykokalyx-Shedding induzierte endogene Heparinisierung bei Schwerverletzten als Teil einer frühen Trauma-induzierten Koagulopathie [42]. Sie entnahmen bei 77 Traumapatienten bei Aufnahme in ein Level 1 Traumazentrum Blut und führten unter anderem ein KaolinTEG sowie ein HeparinaseTEG durch und analysierten Thrombomodulin, einen Biomarker für Zellzerstörung, sowie Syndecan-1 als Marker der Glykokalyx-Zerstörung. Anschließend wurden die Patienten anhand eines TEG-Scores in „endogen heparinisiert“ (n = 4) und „nicht heparinisiert“ (n = 73) stratifiziert und die beiden Gruppen anhand unterschiedlicher Parameter verglichen. Die „endogen heparinisierte“ Gruppe hatte einen signifikant höheren Injury Severity Score, signifikant mehr Transfusionen von Erythrozytenkonzentrat binnen 24 Stunden, circa vierfach gegenüber der „nicht heparinisierten“ Gruppe erhöhte Werte von zirkulierendem Syndecan-1 (Median: 116 ng/mL vs. 31 ng/mL ; $p = 0,02$) sowie signifikant höhere Werte an zirkulierendem Thrombomodulin. In den hämostaseologischen Globaltests zeigte die „endogen heparinisierte“ Gruppe signifikant verlängerte INR (Median 1,4 vs 1,1, $p = 0,013$), aber keine signifikant verlängerte aPTT (Median 28 s vs 25 s). Die Autoren schließen: „the present study demonstrates that 5% of patients with severe injury and trauma have evidence of acute endogenous heparinization by TEG, which appears mechanistically linked to endothelial glycocalyx degradation” [42].

Betrachtet man den von der Gruppe um Johansson erstmals postulierten möglicherweise kausalen Zusammenhang zwischen Glykokalyx-Shedding und endogener Heparinisierung in der Zusammenschau mit von der Gruppe um Burroughs publizierten TEG-Studien zur endogenen Heparinsierung bei infizierten Zirrhotikern und Nicht-Zirrhotikern sowie den in dieser Arbeit durchgeführten ROTEM-Untersuchungen mit Glykokalyx-Bestandteilen und den von Senzolo et al. publizierten TEG-Untersuchungen mit Glykosaminoglykanen, so zeigen sich einerseits mögliche Kausalitäten klarer, andererseits kommen auch methodische Fragen auf. Ostrowski et al. verwendeten zur Stratifizierung ihrer Patienten als „endogen heparinisiert“ und „nicht heparinisiert“ einen Score: „To estimate the degree of endogenous heparinization, differences (Δ) between kaolinTEG and heparinaseTEG for each of the parameters SP, R, K ($\text{heparinaseTEG} - \text{kaolinTEG}$; $\Delta > 0$ indicative of heparinization), angle and MA ($\text{kaolinTEG} - \text{heparinaseTEG}$; $\Delta > 0$ indicative of heparinization) were

calculated. Based on the cumulative number of positive Δ (maximum, five), each patient was scored from 0 to 5.” [42].

Offensichtlich sind hier die Differenzen verkehrt gezogen, da die unter Heparineinfluss in der Regel verlängerte Zeit zur Gerinnungsbildung (hier repräsentiert durch SP = Split Point, r-Zeit und k-Zeit) unter Heparinase-Einfluss kürzer ist. korrekt müsste es also heißen „SP, R, K (*kaolinTEG* – *heparinaseTEG* ; $\Delta > 0$ indicative of heparinization)“. Ähnliches gilt für den alpha-Winkel und die maximale Amplitude: Geht man davon aus, dass die Gerinnung unter Heparineinfluss generell verschlechtert ist, müsste man von höheren Werten für alpha und die maximale Amplitude unter Einfluss von Heparinase ausgehen. Korrekt müsste es also heißen „angle and MA (*heparinaseTEG* – *kaolinTEG* ; $\Delta > 0$ indicative of heparinization)“. Betrachtet man allerdings die in Figur 1 der Publikation [42] dargestellten HeparinaseTEG- und KaolinTEG-Werte eines nach Ostrowskis Rationale „endogen heparinisierten“ Patienten, so zeigt sich, dass es sich bei den falsch gebildeten Differenzen nur um ein Erratum im Methodik-Teil handelt. Tatsächlich wurden sie gebildet, wie in der vorliegenden Arbeit korrigiert. Der von Ostrowski verwendete Score fasst so unterschiedliche Aspekte der Gerinnung wie Gerinnungsaktivierung (SP, r-Zeit), Gerinnungsbildung (alpha-Winkel, k-Zeit) und Gerinnungsfestigkeit (MA) in einem Wert zusammen und macht daran den „Grad der endogenen Heparinisierung“ fest. Es handelt sich hierbei um einen rein qualitativen Score, bei dem jedem Parameter dieselbe Gewichtung über die Aussage „endogen heparinisiert“ versus „nicht heparinisiert“ zugebilligt wird, unabhängig von der Größe des jeweiligen Deltas. Im Vergleich der nach dieser Heuristik stratifizierten Patientengruppen zeigte sich, dass zwischen der „endogen heparinisierten“ (n = 4) und der „nicht heparinisierten“ Gruppe (n = 73) keine signifikanten Unterschiede im nativen kaolinTEG bestanden. Die r-Zeit war für die als „endogen heparinisiert“ stratifizierte Gruppe sogar leicht verkürzt (Median 5,3 min vs. 5,7 min, nicht signifikant). Betrachtet man die in dieser Arbeit erhobenen Daten im Vergleich zwischen HEPTM und INTEM sowie die von Senzolo et al. publizierten HeparinaseTEG versus NativTEG Daten [64] unter einer ähnlichen Heuristik, so wird klar, dass dieser Score den „Grad der endogenen Heparinisierung“ nicht adäquat widerspiegelt. Bei Senzolo et al. gälten alle, auch die mit den niedrigsten Konzentrationen von Heparansulfat und Dermatansulfat inkubierten Blutproben als „endogen heparinisiert“, obwohl sich die einzelnen Werte nur für die jeweils höchste Konzentration signifikant von den nicht mit Testsubstanzen inkubierten Kontrollproben unterschieden. Im Vergleich INTEM versus HEPTM in der vorliegenden Arbeit waren Unterschiede unter dem Einfluss von Heparansulfat ausschließlich für das ROTEM-Äquivalent zur r-Zeit, der Clotting Time (CT)

signifikant und Senzolo et al. zeigten unter dem Einfluss von Heparansulfat eine signifikante und deutliche Verlängerung der r-Zeit [64]. In der Zusammenschau dieser Ergebnisse kann in der vorliegenden Arbeit die Clotting Time im INTEM sowie im Vergleich INTEM versus HEPTTEM im ROTEM als sensitivster Parameter für den Grad von Heparinisierung postuliert werden, angelehnt an die von Zambruni et al. postulierte r-Zeit im TEG [68]. Für die Konzentration K3 von Heparansulfat konnten in der vorliegenden Arbeit signifikante Verlängerungen von aPTT, aPPT-Ratio und TZ gezeigt werden. Für eine weitere Studie wäre eine Messung mit hämostaselogischen Globaltests auch für niedrigere Konzentrationen interessant, um eine mögliche Korrelation zu Veränderungen der Clotting Time untersuchen zu können, ähnlich wie von Zambruni et al. für die Anti-Xa-Konzentration gezeigt [68].

4.3. Glykokalyx-Bestandteile als Marker für Schädigung der Endothelial Surface Layer

Ostrowski et al. maßen in ihrer Arbeit Syndecan-1-Werte im zirkulierenden Blut als Marker für Glykokalyx-Schädigung und zeigten, dass nach oben diskutierter Heuristik als „endogen heparinisiert“ stratifizierte Patienten im Vergleich zu den übrigen Patienten vierfach erhöhte Syndecan-1-Level aufwiesen (Median: 116 ng/mL vs. 31 ng/mL ; $p = 0,02$). Syndecan-1 ist ein Proteoglykan, welches in der Zellmembran des Endothels verankert ist und damit das Rückgrat der mit zirkulierenden und nicht zirkulierenden Glykosaminoglykanen aufgeladenen Glykokalyx darstellt [14]. Shedding von Syndecan-1 wird daher als Indiz für eine schwerwiegende Beschädigung der Glykokalyx betrachtet. Rehm et al. zeigten 2007 in einer Studie mit insgesamt 32 Patienten, an denen große Gefäßeingriffe mit regionaler und globaler Ischämie durchgeführt wurden, erstmals das Shedding der Glykokalyx bei Ischämie/Reperfusion am Menschen [35]. Dazu wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor und während der jeweiligen Operation im Blut von 18 Patienten bei Operation der Aorta ascendens mit kardiopulmonalem Bypass und von 14 Patienten bei Operation eines infrarenalen Aortenaneurysmas die Spiegel von Syndecan-1 und Heparansulfat mittels ELISA bestimmt. Als Basalwerte nach Anästhesie-Einleitung wurden für Syndecan-1 im Median 12 ng/mL (Quartil 1 bis 3: $7,2 \text{ ng/mL}$ bis $14,2 \text{ ng/mL}$) und für Heparansulfat $5,9 \mu\text{g/mL}$ (Quartil 1 bis 3: $4,5 \mu\text{g/mL}$ bis $8,4 \mu\text{g/mL}$) gemessen. Nach globaler Ischämie mit Kreislaufstillstand ($n = 12$) waren die Werte während früher Reperfusion (0 bis 15 Minuten) für Syndecan-1 42-fach und für Heparansulfat 10-fach erhöht. Nach Regionaler Ischämie von Herz und Lunge ($n = 6$) war Syndecan-1 65-fach, Heparansulfat 19-fach erhöht. Nach infrarenaler Ischämie ($n = 14$) war Syndecan-1 15-fach, Heparansulfat 3-fach erhöht. Auf alle drei Patientengruppen bezogen korrelierten die Syndecan-1 und Heparansulfat-

Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt kurz nach Reperfusion positiv ($r = 0,76$; $p < 0,001$). Während der Eingriffe und zu späteren Zeitpunkten nach Reperfusion war dies nicht der Fall. Die ebenfalls gemessenen Plasmakonzentrationen von ICAM-1 und VCAM-1 änderten sich nicht. Rehm et al. schließen „syndecan-1 and heparan sulfate may serve as sensitive markers for shedding of the endothelial glycocalyx” und “Because no change took place in levels of ICAM-1 and VCAM-1, integral membrane proteins, in patients in the present study, circulating components of the endothelial glycocalyx appear to be more sensitive markers of early endothelial cell distress.” [35]

Steppan et al. zeigten 2011 die Zerstörung der Glykokalyx in einer Studie an 104 Sepsis-Patienten und 28 Patienten nach großen Baueingriffen. 18 gesunde Freiwillige dienten als Kontrollgruppe [76]. Sie maßen die Inflammationsmarker ICAM-1, VCAM-1 und IL-6 sowie die Glykokalyx-Bestandteile Syndecan-1 und Heparansulfat zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Sepsis beziehungsweise nach der Operation. Die Inflammationsmarker IL-6, VCAM-1 und ICAM-1 waren in der Sepsisgruppe sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch gegenüber der chirurgischen Gruppe signifikant erhöht. Bei der chirurgischen Gruppe war der IL-6 Wert gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht, VCAM-1 und ICAM-1 wiesen keine signifikante Erhöhung auf. Die Autoren schlossen daraus „Those results confirm the inflammatory process during sepsis and show that patients after major abdominal surgery also experience an inflammatory surge, but to a lesser extend [sic!].” Die als Marker der Glykokalyx-Schädigung gemessenen Glykokalyx-Bestandteile Syndecan-1 und Heparansulfat waren sowohl in der Sepsisgruppe als auch in der chirurgischen Gruppe zu allen Bestimmungszeitpunkten signifikant gegenüber den Kontrollproben erhöht. Die Syndecan-1-Konzentration war dabei bei der Sepsisgruppe am höchsten und gegenüber der chirurgischen Gruppe ebenfalls signifikant erhöht (höchster Wert Sepsisgruppe 48h nach Baseline: $165 \pm 86,5 \text{ ng/mL}$ vs. höchster Wert chirurgische Gruppe 24h nach Baseline $85,6 \pm 131 \text{ ng/mL}$ vs. Kontrollgruppe $20,5 \pm 5,05 \text{ ng/mL}$). Die Heparansulfat-Konzentration hingegen war bei der chirurgischen Gruppe zu allen Zeitpunkten am höchsten und auch gegenüber der Sepsisgruppe signifikant erhöht (höchster Wert chirurgische Gruppe 24h nach Baseline: $8,49 \pm 3,46 \text{ } \mu\text{g/mL}$ vs. höchster Wert Sepsisgruppe 24h nach Baseline: $5,68 \pm 2,43 \text{ } \mu\text{g/mL}$ vs. Kontrollgruppe $1,96 \pm 1,21 \text{ } \mu\text{g/mL}$). Weder für Syndecan-1 noch für Heparansulfat zeigten sich signifikante Unterschiede in der Mortalität. In der Sepsisgruppe korrelierten die Syndecan-1-Spiegel mit den IL-6-Spiegeln. Als mögliche Ursache für die höchsten Syndecan-1-Werte bei Sepsis-Patienten versus den höchsten Heparansulfat-Werten bei chirurgischen Patienten diskutierten Steppan et al. die Tatsache, dass Syndecan-1 als

Transmembranprotein erst bei schwerwiegenderem Endothelschaden abgeschilfert wird. Ein solcher Endothelschaden war an erhöhten ICAM-1 und VCAM-1 Werten in der Sepsisgruppe ersichtlich. Heparansulfat könnte aufgrund seiner oberflächlicheren Lokalisation in der Glykokalyx früher abgeschilfert worden sein, was eventuell schon vor Probenentnahme bei der Sepsisgruppe geschehen sein könnte. Auch könnte das in Sepsis-Patienten häufig eingesetzte Heparin zu einer frühen Abschilferung von Heparansulfat geführt haben.

Hofmann-Kiefer et al. zeigten 2013 erhöhte zirkulierende Konzentrationen der Glykokalyx-Bestandteile Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluronan bei Patientinnen mit HELLP-Syndrom im Vergleich zu gesunden Schwangeren [77]. Dazu führten sie im Blut von gesunden Schwangeren (n = 26) zu vier Zeitpunkten im Gestationsverlauf, von Patientinnen mit HELLP-Syndrom (n = 17) präpartal, sowie von 10 nicht schwangeren Freiwilligen als Kontrollgruppe Messungen mittels ELISA durch. Um den Grad der Inflammation zu zeigen, wurden in allen drei Gruppen zu einem Zeitpunkt Serum-Konzentrationen von TNF- α und von löslichen TNF- α -Rezeptoren (sTNF-Rs) durchgeführt. Bei der Kontrollgruppe zeigten sich folgende Serum-Konzentrationen (jeweils Median, 25./75. Perzentile; n = 10): Syndecan-1 66,4 ng/mL (50,7/69,7), Heparansulfat 6,2 μ g/mL (5,4/8,9) und Hyaluronan 86,0 ng/mL (82,1/93,6). In der Gruppe der gesunden Schwangeren (n = 26) stiegen die Syndecan-1-Spiegel kontinuierlich mit zunehmendem Gestationsalter an und waren unmittelbar präpartal 159-fach und signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. In der HELLP-Gruppe (n = 15) zeigten sich direkt vor der Entbindung noch höhere Werte von 12252 ng/mL (7369/16595), ebenfalls signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe und gegenüber gesunden Schwangeren. Relevant erhöhte Werte für Heparansulfat und Hyaluronan zeigten sich hingegen nur bei Patientinnen mit HELLP-Syndrom (Werte direkt vor Entbindung: Heparansulfat: 15,8 μ g/mL (9,3/25,0); Hyaluronan 624 ng/mL (395/1314), jeweils signifikant gegenüber Kontrollgruppe und gesunden Schwangeren erhöht). Auch sTNF-Rs waren nur bei HELLP-Patientinnen signifikant erhöht, während die Werte für TNF- α sich in keiner der Gruppen signifikant von der Kontrollgruppe unterschieden. Die Beobachtung, dass während unkompliziertem Graviditätsverlauf der Syndecan-1-Spiegel im Blut der Schwangeren sukzessive anstieg, während Heparansulfat und Hyaluronan sich nicht signifikant von der nicht schwangeren Kontrollgruppe unterschieden, interpretierten Hofmann-Kiefer et al. folgendermaßen: Der Syndecan-1-Spiegel bei gesunden Schwangeren ist möglicherweise nicht-endothelialen Ursprungs. Für die HELLP-Gruppe, bei der die Syndecan-1-Erhöhung mit ebenfalls erhöhten Werten von Heparansulfat und Hyaluronan einhergingen (keine Korrelation), diskutierten sie einen endothelialen Ursprung im Sinne

eines Sheddings der endothelialen Glykokalyx. Sie schließen „Whether the maternal endothelium, the placenta, or other organic structures have to be regarded as the origin of glycocalyx components in maternal serum will have to be investigated in further studies.“ [77]

Fasst man die Ergebnisse der Arbeiten von Rehm et al., Steppan et al. und Hofmann-Kiefer et al. zusammen, lassen sich erhöhte zirkulierende Konzentrationen der Glykokalyx-Bestandteile Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluronan als Indikatoren für eine Schädigung der endothelialen Glykokalyx betrachten. Hierbei stellt Syndecan-1 als in der Zellmembran verankertes Proteoglykan wohl den Marker für schwerwiegende Glykokalyx-Zerstörung dar. Korrelationen zwischen den Werten der einzelnen Marker lassen sich nur vereinzelt zeigen. Die von Rehm et al. gezeigte Korrelation von Syndecan-1- und Heparansulfat-Konzentrationen im Blut direkt nach Reperfusion legt folgendes nahe: Während der Ischämie-Phase kam es zu einer schwerwiegenden Schädigung der endothelialen Glykokalyx. Mit Beginn der Reperfusionsphase wurden das luminal lokalisierte Heparansulfat und das in der Zellmembran verankerte Syndecan-1 gleichzeitig abgeschilfert. Steppan et al. beobachteten bei Patientengruppen mit geringem Endothel-Trauma (große abdominalchirurgische Eingriffe) stärker erhöhte Heparansulfat-Werte und bei schwerwiegendem Endotheltrauma (Sepsis) stärker erhöhte Syndecan-1-Werte. Die Vermutung liegt somit nahe, dass Heparansulfat bereits bei geringeren Traumata abgeschilfert wird, während es für eine Syndecan-1-Abschilferung einer massiveren Schädigung bedarf. In der Reperfusionsphase würde nach dieser Vorstellung nach Ischämie und damit schwerwiegender Schädigung Heparansulfat gemeinsam mit Syndecan-1 vom Ort der Ischämie ‚weggespült‘ und beide wären somit zugleich erhöht nachweisbar. Bei Patienten in schwerer Sepsis hingegen könnte abgeschilfertes Heparansulfat bereits zu einem früheren Krankheitszeitpunkt verstoffwechselt oder über den Urin eliminiert worden sein. Messungen aller Parameter sind immer eine Momentaufnahme im komplexen Gleichgewicht des Auf- und Abbaus der endothelialen Glykokalyx. Mit diesem Wissen und den Ergebnissen dieser Arbeit und auch der Arbeit von Senzolo et al. [64] kann als Marker für eine Autoheparinisierung von Patienten mit Shedding der endothelialen Glykokalyx Heparansulfat postuliert werden, welches in den beiden in vitro-Studien kausal für eine heparinartige Verzögerung der Hämostase verantwortlich ist.

4.4. Glykokalyx-Bestandteile und ihr Einfluss auf die PMNL-Aktivierung

Inflammatorische Prozesse gehen in vivo immer mit einer Thrombozytenaktivierung einher und nehmen damit Einfluss auf die Hämostase. Um einen potentiellen inflammatorischen Effekt der Glykokalyx-Bestandteile zu evaluieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die

Produktion von Sauerstoffradikalen in Leukozyten gemessen. Für die Substanzen Heparansulfat und Hyaluronan wurde eine Immunreaktion aufgrund des Ursprungs aus boviner Niere beziehungsweise aus Hahnenkamm durchaus erwartet, für das rekombinant human hergestellte Syndecan-1 nicht. In der Durchflusszytometrie konnte für keine der Testsubstanzen Heparansulfat, Syndecan-1 und Hyaluronan eine Stimulierung von PMNL gezeigt werden. Während die löslichen Stimuli $\text{TNF } \alpha$ & fMLP ($282,1 \pm 72,2$) sowie PMA ($435,2 \pm 127,6$) zu einer hoch signifikanten Erhöhung der Fluoreszenzintensität führten (Kontrolle: $161,4 \pm 78,4$), blieben die Fluoreszenzintensitäten für Heparansulfat, Syndecan-1 und Hyaluronan nahezu unverändert. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Testsubstanzen für sich genommen keinen starken proinflammatorischen Effekt haben. In der vorliegenden Arbeit wurde in den Testproben auf die Stimulierung von PMNL mit löslichen Stimuli wie $\text{TNF } \alpha$ und fMLP verzichtet, um einen möglichen isolierten kausalen proinflammatorischen Effekt der Glykokalyx-Bestandteile Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluronan zu untersuchen. In weiteren Studien sollte eine Kombination von löslichen Stimuli und Glykokalyx-Bestandteilen erfolgen. Dies würde der Situation in vivo näher kommen, da Inflammation in der Regel mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine einhergeht. Der Einfluss der Testsubstanzen auf das Immunsystem lag explizit nicht im Fokus der vorliegenden Arbeit. In der Literatur werden pro- wie antiinflammatorische Wirkungen von Glykokalyx-Bestandteilen diskutiert.

4.5. Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte ein heparinartiger Effekt des Glykokayx-Bestandteils Heparansulfat mittels Rotationsthrombelastometrie und in hämostaseologischen Globaltests eindeutig gezeigt werden. Ein solcher Effekt durch Hyaluronan ist fraglich, während Syndecan-1 isoliert offenbar keinen Einfluss auf die Hämostase hat. Dabei zeigte sich die Clotting Time, also die Zeit bis zur Gerinnselbildung im ROTEM-Ansatz INTEM und im Vergleich INTEM versus HEPTM als sensibler Marker für Heparinisierung. Während selbst unter dem Einfluss höchster Konzentrationen von Heparansulfat die ROTEM-Messwerte sich im Mittel noch im Referenzbereich des Herstellers bewegten, lagen die Ergebnisse der hämostaseologischen Globaltests weit über den vom Institut für Laboratoriumsmedizin angegebenen Grenzwerten. Untersuchungen anderer Autoren, die allerdings allesamt das dem ROTEM® verwandte Verfahren der Thrombelastographie (TEG®) angewendet hatten, sahen tendenziell heparinartige Effekte in der TEG, während hämostaseologische Globaltests nicht signifikant erhöht waren. Da Verfahren der Viskoelastizitätsmessung im Blut zunehmend im klinischen Blutungsmanagement

angewendet werden [78], ist eine Standardisierung der Verfahren anzustreben. Eine Cochrane-Analyse aus dem Jahr 2016 beschreibt den Evidenzgrad TEG- und ROTEM-basierter Transfusionsregimes als „low“ [79] und ruft zu weiteren großen Studien mit „low risk of bias“ auf.

Inwieweit sich der Glykokalyx-Bestandteil Heparansulfat, der als Marker für eine Schädigung der Glykokalyx bei kritisch Kranken herangezogen wird, auch als Marker für die Shedding-bedingte heparinartige Hämostase-Beeinträchtigung gesehen werden kann, muss in weiteren Studien verifiziert werden. Dazu sollten in einem möglichst großen Kollektiv kritisch kranker Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten Blutproben entnommen werden und in diesen einerseits mittels ELISA die jeweiligen Konzentrationen von Heparansulfat ermittelt werden, zum anderen sollten die Gerinnungsparameter aPTT, TZ, Quick/INR und auch Anti-Xa bestimmt und schließlich eine ROTEM-Analyse durchgeführt werden. Dann könnten eventuelle Korrelationen zwischen der Heparansulfat-Konzentration in vivo und den Veränderungen der hämostaselogischen Globaltests, der Anti-Xa-Konzentration und der Clotting Time im INTEM versus HEPTM untersucht werden. Auch sollte, in Anlehnung an die Arbeit von Senzolo et al., Dermatan-sulfat-Konzentrationen gemessen und deren Korrelation mit Gerinnungsparametern überprüft werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die bei einer Zerstörung der endothelialen Glykokalyx freigesetzten Bestandteile zu einer Beeinträchtigung der Hämostase beitragen und untermauert damit weiter die Relevanz dieses wiederentdeckten „Great Barrier Reef“ [29] für die Funktion physiologischer Prozesse im Körper. Vertiefende Untersuchungen zum Einfluss der Glykokalyx auf die Blutgerinnung bei unterschiedlichen Patientengruppen auch in Bezug auf die thrombozytäre Gerinnung sind wünschenswert. Die noch recht junge Erforschung zur Verabreichung Glykokalyx-erhaltender Substanzen wie beispielsweise Antithrombin III und Hydrocortison [80] sollte nicht nur aus Gründen der Erhaltung der vaskulären Permeabilitätsbarriere, sondern auch aus Gründen der intakten Hämostase vorangetrieben werden.

5. Synopsis/Zusammenfassung

Die vorliegende Synopsis dient als Zusammenfassung der Dissertationsschrift. Für ein tieferes Verständnis der Hintergründe, das Nachvollziehen der angewendeten Methodiken, sowie die ausführliche Diskussion wird auf die Hauptarbeit verwiesen.

5.1. Die endotheliale Glykokalyx, eine für die Antikoagulation bedeutsame Struktur in Blutgefäßen

Die endotheliale Glykokalyx ist eine Schicht aus Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen, die das vaskuläre Endothel luminal auskleidet. Aufgrund ihrer Fragilität konnte sie lange Zeit nicht in ihrer tatsächlichen Größe dargestellt werden. Erst in den vergangenen beiden Jahrzehnten wurde herausgefunden, dass sie mit Schichtdicken zwischen $0,5\ \mu\text{m}$ in Kapillaren bis zu $4,5\ \mu\text{m}$ in großen arteriellen Gefäßen teils dicker ist, als das Endothel selbst [29]. Die aus dieser Erkenntnis resultierende nähere Erforschung zeigte sukzessive, dass die endotheliale Glykokalyx einen vitalen Anteil an der vaskulären Barriere hat, insbesondere für den Aufbau des kolloidosmotischen Gradienten, der Flüssigkeit entgegen des hydrostatischen Drucks im Gefäß hält [25]. Viele vaskuläre Pathologien gehen mit einer (teilweisen) Zerstörung der Glykokalyx einher. In den letzten Jahren wurde nachgewiesen, dass die Glykokalyx in unterschiedlichem Ausmaß bei Ischämie/Reperfusion, Arteriosklerose, Diabetes mellitus, hämatogener Tumormetastasierung und Sepsis geschädigt wird [29]. Ostrowski und Johansson schrieben den nach der Zerstörung der Glykokalyx im Blut zirkulierenden Glykokalyx-Bestandteilen einen antikoagulatorischen Effekt zu. Sie hatten im Blut von polytraumatisierten Patienten die Konzentrationen des Glykokalyx-Bestandteils Syndecan-1 gemessen und festgestellt, dass dieser bei „endogen heparinisierten“ Patienten erheblich gegenüber anderen Patienten erhöht war [42]. In der vorliegenden Arbeit werden nun potentielle Kausalitäten zwischen einer beeinträchtigten Hämostase und den Glykokalyx-Bestandteilen Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluronan untersucht.

5.2. Fragestellung

Es wird postuliert, dass hohe Blutkonzentrationen der Glykokalyxbestandteile Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat Einfluss auf eine funktionierende Blutgerinnung haben können. Besonders hohe Blutwerte werden im Rahmen der Sepsis detektiert. In dieser in vitro Studie wird vermutet, dass eine steigende Blutkonzentration dieser drei Substanzen mit einer gesteigerten Beeinträchtigung der Hämostase vergesellschaftet ist. Durch die Anwendung verschiedener Blutkonzentrationen (klinikinterne Erfahrungswerte von unterschiedlichen Patientengruppen) und deren Analyse mittels hämostaseologischer Globaltests (Quick, aPTT,

Thrombinzeit) und Rotationsthrombelastometrie sollen beeinträchtigende Faktoren der Blutgerinnung identifiziert und charakterisiert werden.

5.2.1. Primäres Studienziel

Eine mögliche Beeinträchtigung der Blutgerinnung durch verschiedene Konzentrationen der Glykokalyxbestandteile Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat soll mittels Rotationsthrombelastometrie detektiert werden.

5.2.2. Sekundäre Studienziele

Eine mögliche Beeinträchtigung der Blutgerinnung durch verschiedene Konzentrationen der Glykokalyxbestandteile Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat soll mittels der hämostaseologischen Globaltests Quick, aPTT und Thrombinzeit überprüft werden. Desweiteren soll die Arbeit den Einfluss der Glykokalyxbestandteile Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat auf die Granulozytenfunktion untersuchen.

5.3. Methodik

Die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit der Studie (Projekt-Nummer 386-13) wurde von der Ethikkommission der LMU München zuerkannt. Rekrutiert wurden 10 gesunde, männliche Probanden aus den Assistenzärzten der Klinik für Anaesthesiologie. Den nüchternen Probanden wurde einmalig periphervenös 41 mL Blut in mehreren Citrat-Monovetten (hämostaseologische Globaltests & ROTEM) und heparinisierten Monovetten (Durchflusszytometrie) abgenommen. Die käuflich erworbenen Testsubstanzen Heparansulfat (aus boviner Niere), Hyaluronan (aus Hahnenkamm) und Syndecan-1 (rekombinant human) wurden für die Tests dem Citrat-Vollblut (Globaltests & ROTEM) und dem für die Durchflusszytometrie hergestellten leukozytenreichen Plasma entsprechend der nach Tabelle 1 zu erreichenden Zielkonzentrationen zugesetzt. Die Zielkonzentrationen entstammten unveröffentlichten klinikinternen Daten aus unterschiedlichen Patientenkollektiven, wobei die höchsten Konzentrationen K3 den Konzentrationen im Blut von Sepsis-Patienten entsprachen. Für alle Tests erfolgten Kontrollmessungen im Probandenblut ohne Zusatz der jeweiligen Testsubstanzen.

Die **hämostaseologischen Globaltests** wurden für Kontrollproben und Testproben der Konzentration K3 vom Institut für Laboratoriumsmedizin nach Klinikstandard durchgeführt. Die ROTEM-Analysen und die Durchflusszytometrie-Messungen machte der Autor selbst im Labor der Klinik für Anaesthesiologie.

	Konzentration	Ziel- konzentration	FACS	Hämostaseologische Globaltests	ROTEM
Syndecan-1	K 1	180 ng/mL			X
	K 2	480 ng/mL			X
	K 3	650 ng/mL	X	X	X
Hyaluronan	K 1	400 ng/mL			X
	K 2	700 ng/mL			X
	K 3	1800 ng/mL	X	X	X
Heparansulfat	K 1	18 µg/mL			X
	K 2	25 µg/mL			X
	K 3	35 µg/mL	X	X	X

Tabelle 1: Zielkonzentrationen der Testsubstanzen für die Durchflusszytometrie (FACS), hämostaseologische Globaltests und Rotationsthrombelastometrie (ROTEM)

In der **Rotationsthrombelastometrie** wurden für die Kontrollmessungen und die Konzentrationen K1, K2 und K3 der drei Testsubstanzen jeweils die ROTEM-Ansätze INTEM (intrinsische Gerinnungsaktivierung), HEPTTEM (intrinsische Gerinnungsaktivierung unter Antagonisierung von Heparinwirkung durch Heparinase), EXTEM (extrinsische Gerinnungsaktivierung) sowie FIBTEM (extrinsische Gerinnungsaktivierung unter Ausschaltung des thrombozytären Anteils durch Cytochalasin D) durchgeführt. Es wurden Parameter für die Zeit bis zur Gerinnselentstehung (Clotting Time, CT), die Dynamik der Gerinnselentstehung (Clot Formation Time, CFT und alpha-Winkel, α), die Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten, die maximale Gerinnselfestigkeit (Amplitude nach 10 min, A10 und Maximum Clot Firmness, MCF) sowie die Maximale Lyse (ML) gemessen. Durch den Vergleich der Messungen im HEPTTEM und INTEM sollten etwaige heparinartige Effekte der Testsubstanzen gezeigt werden.

In der **Durchflusszytometrie** wurde die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale als Indikator für PMNL-Aktivität anhand entstehender Fluoreszenz mit dem Fluoreszenzmarker Dihydrorhodamin gemessen. Um die Stimulierbarkeit der Probandenproben nachzuweisen, wurden neben den Kontrollproben und den mit K3 der Testsubstanzen inkubierten Proben auch Proben mit bekannten löslichen Stimuli (fMLP, TNF- α , PMA) gemessen.

5.4. Statistik

Die Daten wurden nach Shapiro-Wilk auf Normalverteilung überprüft. Anschließend erfolgte, sofern die Daten normalverteilt waren, eine Repeated Measures Analysis of Variance (RM ANOVA) und eine Berechnung der Signifikanz gegenüber dem Kontrollwert nach Holm-Sidak. Nicht normalverteilte Daten wurden mit einer Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks untersucht. Signifikante Unterschiede zum Kontrollwert wurden nach

Dunnett berechnet. Für $p < 0,05$ wurde ein Unterschied als „signifikant“ gewertet, für $p < 0,01$ als „hoch signifikant“. Die Ergebnisse wurden mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt.

5.5. Hauptergebnisse

5.5.1. Hämostase

Für Heparansulfat konnte ein deutlicher heparinartiger Effekt gefunden werden. Dieser zeigte sich einerseits in den hämostaseologischen Globaltests: Hier war der intrinsische Gerinnungsparameter aPTT (55 ± 10 s vs. 28 ± 2 s; $p < 0,05$) unter dem Einfluss von Heparansulfat K3 gegenüber den Kontrollen fast verdoppelt, die gemeinsame Endstrecke der Gerinnungsaktivierung, repräsentiert durch die Thrombinzeit, um mehr als das Sechsfache erhöht (146 ± 14 s vs. 20 ± 2 s; $p < 0,05$). Der heparinartige Einfluss von Heparansulfat bestätigte sich auch in der Rotationsthrombelastometrie: Im INTEM war die Clotting Time für die Konzentrationen K1 ($229,2 \pm 35,4$ s) und K2 ($227,1 \pm 32,0$) hoch signifikant verlängert, K3 zeigte keine signifikante Verlängerung zur Kontrolle ($192,2 \pm 14,0$ s K3 vs. $186,8 \pm 18,0$ s Kontrolle). Im Vergleich der Messungen im INTEM und HEPTM war die Clotting Time für alle Konzentrationen deutlich verlängert, für K2 ($+ 49,2 \pm 29,2$ s) und K3 ($+ 40,1 \pm 26,9$ s) war dieser Unterschied signifikant ($p < 0,05$). Die Werte der extrinsischen Globaltests INR und Quick waren für Heparansulfat der Konzentration K3 nicht signifikant gegenüber den Kontrollproben verändert. Hyaluronan und Syndecan-1 führten für keinen der hämostaseologischen Globaltests zu signifikanten Veränderungen gegenüber den Kontrollen. Für Hyaluronan erschien der heparinartige Effekt im isolierten INTEM und INTEM versus HEPTM fraglich. Für Syndecan-1 stellte sich kein heparinartiger Effekt dar. Für alle Substanzen fanden sich in der Rotationsthrombelastometrie tendenziell mit steigenden Substanzkonzentrationen zunehmende, aber in unterschiedlichem Maße signifikante und nicht signifikante Verzögerungen der Gerinnselfbildung (Verlängerung der CFT, Abflachung des alpha-Winkels) und Abnahme der Gerinnselfestigkeit nach 10 Minuten (A10) und der maximalen Gerinnselfestigkeit (MCF). Diese bewegten sich in den meisten Fällen innerhalb des vom Hersteller angegebenen Referenzbereichs. Abbildung 1 veranschaulicht die wichtigsten hämostaseologischen Ergebnisse grafisch.

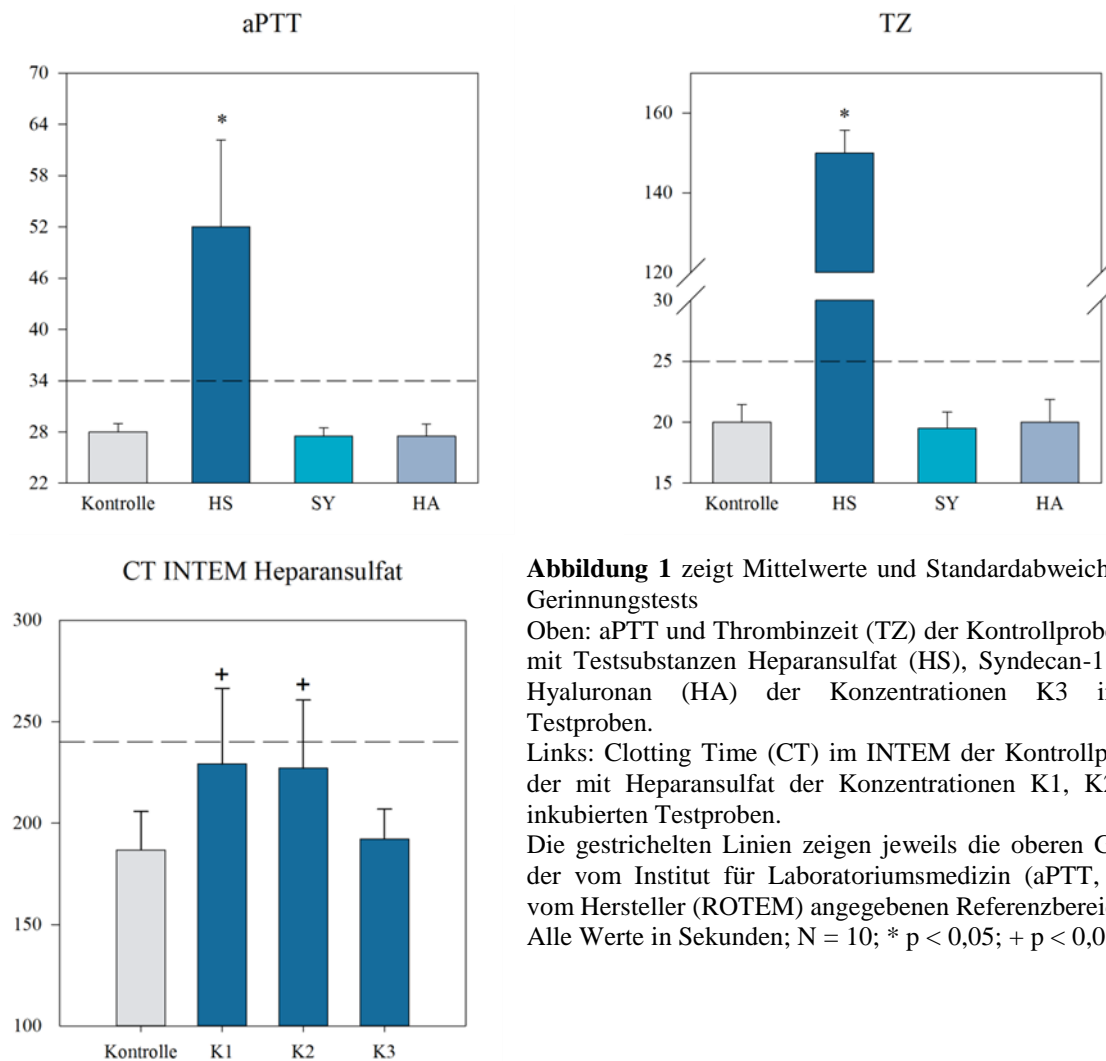


Abbildung 1 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der Gerinnungstests

Oben: aPTT und Thrombinzeit (TZ) der Kontrollproben und der mit Testsubstanzen Heparansulfat (HS), Syndecan-1 (SY) und Hyaluronan (HA) der Konzentrationen K3 inkubierten Testproben.

Links: Clotting Time (CT) im INTEM der Kontrollproben und der mit Heparansulfat der Konzentrationen K1, K2 und K3 inkubierten Testproben.

Die gestrichelten Linien zeigen jeweils die oberen Grenzwerte der vom Institut für Laboratoriumsmedizin (aPTT, TZ) bzw. vom Hersteller (ROTEM) angegebenen Referenzbereiche.

Alle Werte in Sekunden; N = 10; * p < 0,05; + p < 0,01

5.5.2. PMNL-Stimulierung

In der Durchflusszytometrie konnte für keine der Testsubstanzen Heparansulfat, Syndecan-1 und Hyaluronan eine Stimulierung von PMNL aufgezeigt werden. Während die löslichen Stimuli TNF α & fMLP ($282,1 \pm 72,2$) sowie PMA ($435,2 \pm 127,6$) zu einer hoch signifikanten Erhöhung der Fluoreszenzintensität führten (Kontrolle: $161,4 \pm 78,4$), blieben die Fluoreszenzintensitäten für Heparansulfat, Syndecan-1 und Hyaluronan nahezu unverändert. Zur graphischen Darstellung siehe Abbildung 2. In der vorliegenden Arbeit wurde in den Testproben auf die Stimulierung von PMNL mit löslichen Stimuli wie TNF α und fMLP verzichtet, um einen möglichen isolierten kausalen proinflammatorischen Effekt der Glykokalyx-Bestandteile Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluronan zu untersuchen. In weiteren Studien sollte eine Kombination von löslichen Stimuli und Glykokalyx-Bestandteilen erfolgen. Dies würde der Situation in vivo näher kommen, da Inflammation in der Regel mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine einhergeht.

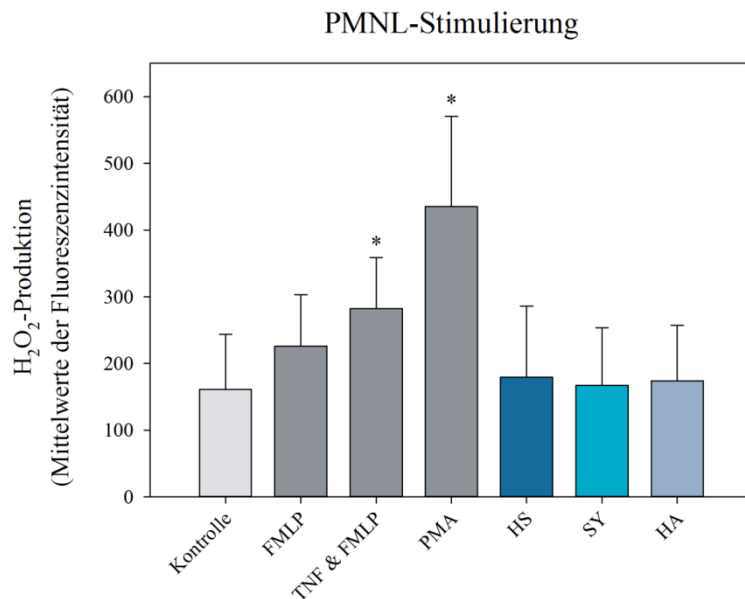


Abbildung 2 zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Kontrolle, die Kontrollproben, welche zu einer Aktivierung führen sollten (fMLP, TNF & fMLP, PMA), sowie die mit den Testsubstanzen Heparansulfat (HS), Syndecan-1 (SY) und Hyaluronan (HA) der Konzentrationen K3 inkubierten Testproben. N = 10; * p < 0,001

5.6. Diskutierte Themen und Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde ein heparinartiger Effekt des Glykokalyx-Bestandteils Heparansulfat mittels Rotationsthrombelastometrie und in hämostaseologischen Globaltests eindeutig nachgewiesen. Ein solcher Effekt durch Hyaluronan ist fraglich, während Syndecan-1 isoliert offenbar keinen Einfluss auf die Hämostase hat. Einen heparinartigen Effekt von Heparansulfat hatten bereits Senzolo et al. beschrieben [64]. Die Clotting Time, also die Zeit bis zur Gerinnselformung, im ROTEM-Ansatz INTEM und im Vergleich INTEM versus HEPTM wurde als sensibler Marker für Heparinisierung postuliert. Ähnliches hatten andere Arbeiten zum Thema Autoheparinisierung mittels Thrombelastografie (TEG) bei Patienten mit unterschiedlichen Leberpathologien gezeigt [68]. Die von Ostrowski und Johansson postulierte Autoheparinisierung unter dem Einfluss von Glykokalyx-Bestandteilen kann mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit untermauert werden, wobei eine Kausalität für Heparansulfat herausgefunden wurde. Die von den Autoren angewendete Stratifikationsheuristik in „endogen heparinisiert“ versus „nicht heparinisiert“ [42] wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings als ungeeignet eingestuft. Die Autoren hatten auch von Heparin nicht signifikant beeinflussbare Faktoren wie Gerinnselfestigkeit und Gerinnselformungszeit als der beeinflussbaren Zeit zur Gerinnselformung gleichwertige Distinktionsmerkmale herangezogen.

Auch wurde in der vorliegenden Arbeit erörtert, dass Untersuchungen anderer Autoren, die allerdings allesamt das dem ROTEM® verwandte Verfahren der Thrombelastographie (TEG®) angewendet hatten, tendenziell heparinartige Effekte in der TEG sahen, während hämostaseologische Globaltests nicht signifikant erhöht waren. In der vorliegenden Arbeit

verhielt sich dies genau umgekehrt. Da Verfahren der Viskoelastizitätsmessung im Blut zunehmend im klinischen Blutungsmanagement angewendet werden [78], ist eine Standardisierung der Verfahren anzustreben. Eine Cochrane-Analyse aus dem Jahr 2016 beschreibt den Evidenzgrad TEG- und ROTEM-basierter Transfusionsregimes als „low“ [79] und ruft zu weiteren großen Studien mit „low risk of bias“ auf.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die bei einer Zerstörung der endothelialen Glykokalyx freigesetzten Bestandteile zu einer Beeinträchtigung der Hämostase führen und untermauert damit weiter die Relevanz dieses wiederentdeckten „Great Barrier Reef“ [29] für die Funktion physiologischer Prozesse im Körper. Vertiefende Untersuchungen zum Einfluss der Glykokalyx auf die Blutgerinnung in unterschiedlichen Patientengruppen auch im Bezug auf die thrombozytäre Gerinnung sind wünschenswert. Die noch recht junge Erforschung zur Verabreichung Glykokalyx-erhaltender Substanzen wie beispielsweise Antithrombin III und Hydrocortison [80] sollte nicht nur aus Gründen der Erhaltung der vaskulären Permeabilitätsbarriere, sondern auch aus Gründen der intakten Hämostase vorangetrieben werden.

6. Anhang

6.1.	<i>Eidesstattliche Versicherung</i>	108
6.2.	<i>Ethikvotum</i>	109
6.3.	<i>Referenzwerte ROTEM®</i>	110

6.1. Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Enzinger, Max Christoph

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Einfluss verschiedener Konzentrationen der Glykokalyx-Bestandteile Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat auf die Hämostase; eine in-vitro Studie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 06.06.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

6.2. Ethikvotum



Ethikkommission · Pettenkoferstr. 8 · 80336 München

Herrn
Prof. Dr. M. Rehm
Klinik f. Anästhesiologie
Klinikum Großhadern
81377 München

Vorsitzender:
Prof. Dr. W. Eisenmenger
Telefon+49 (0)89 5160 - 5191
Telefax+49 (0)89 5160 - 5192
Ethikkommission@
med.uni-muenchen.de

www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Postanschrift:
Pettenkoferstr. 8a
D-80336 München

Hausanschrift:
Pettenkoferstr. 8
D-80336 München
München, 30.10.2013 Hb / sc

Titel:	Einfluss verschiedener Konzentrationen der Glykokalixbestandteile Syndecan-1, Hyaluronan und Heparansulfat auf die Hämostase
Antragssteller:	Prof. Dr. M. Rehm
Projekt-Nr:	386-13

Sehr geehrter Herr Kollege Rehm,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 24.10.2013 mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen (EK- Antrag, CV Prof. Rehm, Protokoll, Probandeninformation und Einverständniserklärung).

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Ein Hinweis: Da abhängig Beschäftigte als Probanden rekrutiert werden sollen, erscheint es unter dem Blickwinkel der Transparenz geboten, dass die Freiwilligkeit der Studienteilnahme durch den Personalrat bestätigt wird.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Änderungen des Studienprotokolls sind der EK mitzuteilen. Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

Unterschrift in online-Ausgabe entfernt

Prof. Dr. W. Eisenmenger
Vorsitzender der Ethikkommission

Mitglieder der Kommission:
Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender)
PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. D. Kunze, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. H. H. Müller, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeiffer, Dr. Ch. Zach

6.3. Referenzwerte ROTEM®

Reference Ranges ROTEM®

Test name (reagent)	CT (s)	CFT (s)	α Angle	A 10 (mm)	A 15 (mm)	A 20 (mm)	A 25 (mm)	MCF (mm)	CLI 30 (%)	ML (%) ¹⁾
INTEM (in-tem® / in-tem® S)	100-240	30-110	70-83	44-66	48-69	50-71	50-72	50-72	94-100	< 15
HEPTEM (hep-tem® / hep-tem® S)	Comparison with INTEM. A better clot quality in HEPTEM as compared to INTEM indicates the presence of heparin or heparin-like anticoagulants in the sample									
EXTEM (ex-tem® / ex-tem® S / r ex-tem®)	38-79	34-159	63-83	43-65	48-69	50-71	50-72	50-72	94-100	< 15
APTEM (ap-tem® / ap-tem® S)	Comparison with EXTEM. A better clot formation with ap-tem® when compared to ex-tem® is an early sign of hyperfibrinolysis									
FIBTEM (fib-tem® / fib-tem® S)	n.d	n.d	n.d	7-23	n.d	8-24	n.d	9-25	n.d	n.d
	MCF < 9 mm is a sign of decreased fibrinogen or disturbed clot polymerisation MCF > 25 mm is a sign of elevated fibrinogen levels (which may lead to a normal EXTEM or INTEM in spite of thrombocytopenia)									
NATEM (star-tem®)	300-1000 ²⁾	150-700 ²⁾	30-70 ²⁾			35-60 ²⁾		40-65 ²⁾	94-100 ²⁾	< 15 ²⁾

¹⁾ within 1 hour of measurement

²⁾ NATEM values strongly depend on pre-analytical factors. The values in the table are taken from a small study (n=76)

DISCLAIMER:

ROTEM® reference ranges have been determined in several clinical centres on reference group samples with no signs of impaired coagulation (n>140). Please note that reference ranges for coagulation parameters depend on the respective reference population, the blood sampling technique and other pre-analytical factors. It is recommended to confirm the ranges by a hospital specific reference group.

CAUTION:

MCF value: If the measurement is stopped while the curve is still rising, then this parameter only represents the highest amplitude reached at this point in time. However, it does not show the actual clotting capability of the sample. Therefore for analysis of the MCF only stop a measurement after the maximum of the MCF has been reached, which can be easily recognised as the curve is not longer rising.

7. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Professor Markus Rehm, für die Überlassung des Themas, die persönliche Betreuung, sowie die stets zeitnahe Verfügbarkeit für Gespräche und Korrekturen.

Mein besonderer Dank gilt der Mitbetreuerin meiner Arbeit, Frau Doktor Judith-Irina Buchheim. Ihre Unterstützung und Geduld halfen mir nicht nur in der Laborarbeit, auch stand sie mir beim Schreiben der Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite. Den Fokus in einer Flut von Publikationen zu finden, wurde so um Einiges leichter.

Ebenfalls besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Marion Hörl für die Einarbeitung in die Laborarbeit und die tatkräftige Unterstützung vor allem bei der Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen.

Last but not least geht ein großer Dank an meine Familie und Freunde, die mich jederzeit moralisch unterstützten und damit auch über Durststrecken hinweghalfen.

8. Literaturverzeichnis

1. Pries, A.R. and W.M. Kuebler, *Normal Endothelium*, in *The Vascular Endothelium I*, S. Moncada and A. Higgs, Editors. 2006, Springer Berlin Heidelberg. p. 1-40.
2. *WHO Health estimates 2000-2015*. 29.05.2017]; Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html.
3. Cahill, P.A. and E.M. Redmond, *Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health*. *Atherosclerosis*, 2016. **248**: p. 97-109.
4. Danielli, J.F., *Capillary permeability and oedema in the perfused frog*. *J Physiol*, 1940. **98**(1): p. 109-29.
5. Chambers, R. and B.W. Zweifach, *INTERCELLULAR CEMENT AND CAPILLARY PERMEABILITY*. Vol. 27. 1947. 436-463.
6. Luft, J.H., *Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red*. *Fed Proc*, 1966. **25**(6): p. 1773-83.
7. Klitzman, B. and B.R. Duling, *Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle*. *Am J Physiol*, 1979. **237**(4): p. H481-90.
8. Fåhræus, R. and T. Lindqvist, *THE VISCOSITY OF THE BLOOD IN NARROW CAPILLARY TUBES*. *American Journal of Physiology -- Legacy Content*, 1931. **96**(3): p. 562-568.
9. Desjardins, C. and B.R. Duling, *Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit*. *Am J Physiol*, 1990. **258**(3 Pt 2): p. H647-54.
10. Henry, C.B. and B.R. Duling, *Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(2 Pt 2): p. H508-14.
11. Rehm, M., et al., *Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed*. *Anesthesiology*, 2004. **100**(5): p. 1211-23.
12. van Haaren, P.M., et al., *Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **285**(6): p. H2848-56.
13. Megens, R.T., et al., *Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. Combined structural and functional imaging with subcellular resolution*. *J Vasc Res*, 2007. **44**(2): p. 87-98.
14. Reitsma, S., et al., *The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization*. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 2007. **454**(3): p. 345-359.
15. Carey, D.J., *Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors*. *Biochem J*, 1997. **327 (Pt 1)**: p. 1-16.
16. Fransson, L.A., et al., *Novel aspects of glypican glycobiology*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(9): p. 1016-24.
17. Iozzo, R.V., *Perlecan: a gem of a proteoglycan*. *Matrix Biol*, 1994. **14**(3): p. 203-8.
18. Kinsella, M.G., S.L. Bressler, and T.N. Wight, *The regulated synthesis of versican, decorin, and biglycan: extracellular matrix proteoglycans that influence cellular phenotype*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2004. **14**(3): p. 203-34.
19. Weinbaum, S., J.M. Tarbell, and E.R. Damiano, *The structure and function of the endothelial glycocalyx layer*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2007. **9**: p. 121-67.
20. Pries, A.R., T.W. Secomb, and P. Gaehtgens, *The endothelial surface layer*. *Pflugers Arch*, 2000. **440**(5): p. 653-66.

21. Mulivor, A.W. and H.H. Lipowsky, *Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2004. **286**(5): p. H1672-H1680.
22. Nandi, A., P. Estess, and M.H. Siegelman, *Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 14939-48.
23. Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi, *Hyaluronan synthases*. J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.
24. Starling, E.H., *On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces*. The Journal of Physiology, 1896. **19**(4): p. 312-326.
25. Adamson, R.H., et al., *Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels*. The Journal of Physiology, 2004. **557**(Pt 3): p. 889-907.
26. Jacob, M., et al., *The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(3): p. 575-86.
27. Levick, J.R., *Revision of the Starling principle: new views of tissue fluid balance*. The Journal of Physiology, 2004. **557**(Pt 3): p. 704-704.
28. Curry, F.E. and C.C. Michel, *A fiber matrix model of capillary permeability*. Microvasc Res, 1980. **20**(1): p. 96-9.
29. Chappell, D., et al., *Expedition Glykokalyx*. Der Anaesthesist, 2008. **57**(10): p. 959-969.
30. Vink, H. and B.R. Duling, *Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(1): p. H285-9.
31. Bruegger, D., et al., *Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2005. **289**(5): p. H1993-H1999.
32. Rehm, M., et al., *Changes in blood volume and hematocrit during acute preoperative volume loading with 5% albumin or 6% hetastarch solutions in patients before radical hysterectomy*. Anesthesiology, 2001. **95**(4): p. 849-56.
33. Rehm, M., et al., *Changes in intravascular volume during acute normovolemic hemodilution and intraoperative retransfusion in patients with radical hysterectomy*. Anesthesiology, 2000. **92**(3): p. 657-64.
34. Chappell, D., et al., *Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx*. Anesthesiology, 2007. **107**(5): p. 776-84.
35. Rehm, M., et al., *Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia*. Circulation, 2007. **116**(17): p. 1896-906.
36. Nieuwdorp, M., et al., *Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo*. Diabetes, 2006. **55**(2): p. 480-6.
37. Vlodavsky, I., et al., *Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer progression*. Thromb Res, 2007. **120 Suppl 2**: p. S112-20.
38. Vink, H., A.A. Constantinescu, and J.A.E. Spaan, *Oxidized Lipoproteins Degrade the Endothelial Surface Layer*. Implications for Platelet-Endothelial Cell Adhesion, 2000. **101**(13): p. 1500-1502.
39. van den Berg, B.M., et al., *Atherogenic region and diet diminish glycocalyx dimension and increase intima-to-media ratios at murine carotid artery bifurcation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(2): p. H915-20.

40. Nelson, A., et al., *Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma*. Shock, 2008. **30**(6): p. 623-7.
41. Henry, C.B.S. and B.R. Duling, *TNF- α increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2000. **279**(6): p. H2815-H2823.
42. Ostrowski, S.R. and P.I. Johansson, *Endothelial glycocalyx degradation induces endogenous heparinization in patients with severe injury and early traumatic coagulopathy*. J Trauma Acute Care Surg, 2012. **73**(1): p. 60-6.
43. Spannagl, M. and G. Moessmer, *Hämostaseologische Globaltests*. Hämostaseologie, 2006. **26**(1): p. 27-37.
44. Pötzsch, B. and K. Madlener, *Globaltests und Einzelfaktoren*, in *Hämostaseologie*, B. Pötzsch and K. Madlener, Editors. 2010, Springer Berlin Heidelberg. p. 861-866.
45. *Beipackzettel: "Thromborel(R) S"*. Dade Behring.
46. Smith, S.A., P.C. Comp, and J.H. Morrissey, *Phospholipid composition controls thromboplastin sensitivity to individual clotting factors*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2006. **4**(4): p. 820-827.
47. Quick, A.J., M. Stanley-Brown, and F.W. Bancroft, *A STUDY OF THE COAGULATION DEFECT IN HEMOPHILIA AND IN JAUNDICE.**. The American Journal of the Medical Sciences, 1935. **190**(4).
48. Kirkwood, T.B., *Calibration of reference thromboplastins and standardisation of the prothrombin time ratio*. Thromb Haemost, 1983. **49**(3): p. 238-44.
49. WHO, *Annex 3: Guidelines for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy*. WHO Technical Report Series, 1999. **No. 889**.
50. *Beipackzettel: "Dade(R) Actin(R) FSL Reagenz zur Bestimmung der aPTT*. Siemens.
51. *Beipackzettel: "BC-Thrombin-Reagenz"*. Siemens.
52. Johnson, K.L., *Basics of flow cytometry*. Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology, 1992. **5**(1): p. 22-24.
53. Goetzman, E.A., *Flow cytometry: basic concepts and clinical applications in immunodiagnosics*. Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology, 1993. **6**(3): p. 177-182.
54. *Introduction to Flow Cytometry Web-Based Training*. 06.08.2014]; Available from: http://www.bdbiosciences.com/services/training/itf_launch.jsp.
55. Baldrige, C.W.G.R.W., *THE EXTRA RESPIRATION OF PHAGOCYTOSIS*. American Journal of Physiology -- Legacy Content, 1932. **103**(1): p. 235-236.
56. Fantone, J.C. and P.A. Ward, *Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions*. Am J Pathol, 1982. **107**(3): p. 395-418.
57. Emmendorffer, A., et al., *A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123*. Journal of Immunological Methods, 1990. **131**(2): p. 269-275.
58. Rothe, G., A. Oser, and G. Valet, *Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes*. Naturwissenschaften, 1988. **75**(7): p. 354-355.
59. *Tem International GmbH: Thromboelastometrie*. 07.08.2014]; Available from: <http://www.rotam.de/methodik/thromboelastometrie/>.
60. Hartert, H., *Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren*. Klinische Wochenschrift, 1948. **26**(37-38): p. 577-583.

61. Tem International GmbH: ROTEM(R) delta. 25.08.2014]; Available from: <http://www.rotem.de/produkte/rotem-delta/>.
62. ROTEM(R) delta Manual 1.6.0.01. DE 2009. Pentapharm GmbH.
63. Tem International GmbH: ROTEM(R) Analyse. 07.08.2014]; Available from: <http://www.rotem.de/methodik/rotem-analyse/>.
64. Senzolo, M., et al., *The effects of glycosaminoglycans on coagulation: a thromboelastographic study*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2007. **18**(3): p. 227-36.
65. Sankarankutty, A., et al., *TEG(®) and ROTEM(®) in trauma: similar test but different results?* World Journal of Emergency Surgery : WJES, 2012. **7**(Suppl 1): p. S3-S3.
66. Levi, M. and S.M. Opal, *Coagulation abnormalities in critically ill patients*. Critical Care, 2006. **10**(4): p. 222-222.
67. Montalto, P., et al., *Bacterial infection in cirrhosis impairs coagulation by a heparin effect: a prospective study*. Journal of Hepatology, 2002. **37**(4): p. 463-470.
68. Zambruni, A., et al., *Endogenous heparin-like activity detected by anti-Xa assay in infected cirrhotic and non-cirrhotic patients*. Scand J Gastroenterol, 2004. **39**(9): p. 830-6.
69. Thalheimer, U., et al., *Endogenous heparinoids in acute variceal bleeding*. Gut, 2005. **54**(2): p. 310-311.
70. Agarwal, S., et al., *The prevalence of a heparin-like effect shown on the thromboelastograph in patients undergoing liver transplantation*. Liver Transpl, 2008. **14**(6): p. 855-60.
71. Zmuda, K., D. Neofotistos, and C.H. Ts'ao, *Effects of unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, and heparinoid on thromboelastographic assay of blood coagulation*. Am J Clin Pathol, 2000. **113**(5): p. 725-31.
72. Klein, S.M., et al., *Thromboelastography as a perioperative measure of anticoagulation resulting from low molecular weight heparin: a comparison with anti-Xa concentrations*. Anesth Analg, 2000. **91**(5): p. 1091-5.
73. Haywood-Watson li, R., et al., *Human Micro-Vascular Barrier Disruption after Hemorrhagic Shock*. Journal of Surgical Research, 2010. **158**(2): p. 313.
74. Haywood-Watson, R.J., et al., *Modulation of syndecan-1 shedding after hemorrhagic shock and resuscitation*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23530.
75. Johansson, P.I., et al., *A high admission syndecan-1 level, a marker of endothelial glycocalyx degradation, is associated with inflammation, protein C depletion, fibrinolysis, and increased mortality in trauma patients*. Ann Surg, 2011. **254**(2): p. 194-200.
76. Steppan, J., et al., *Sepsis and Major Abdominal Surgery Lead to Flaking of the Endothelial Glycocalix*. Journal of Surgical Research, 2011. **165**(1): p. 136-141.
77. Hofmann-Kiefer, K.F., et al., *Increased Serum Concentrations of Circulating Glycocalyx Components in HELLP Syndrome Compared to Healthy Pregnancy: An Observational Study*. Reproductive Sciences, 2013. **20**(3): p. 318-325.
78. Maegele, M., et al., *Frühe viskoelastizitätsbasierte Gerinnungstherapie bei blutenden Schwerverletzten*. Der Anaesthetist, 2015. **64**(10): p. 778-794.
79. Wikkelsø, A., et al., *Thromboelastography (TEG) or thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemostatic treatment versus usual care in adults or children with bleeding*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2016(8).
80. Chappell, D., et al., *Protection of glycocalyx decreases platelet adhesion after ischaemia/reperfusion: an animal study*. Eur J Anaesthesiol, 2014. **31**(9): p. 474-81.